

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien
Universität Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend

ehemaliger
Direktor : Professor Dr.med. Gotthard S c h e t t l e r

Untersuchungen zur klärungsinduzierenden Wirkung
eines natürlichen Heparinoids

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich S c h u l z
aus Pritzwalk

1969
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien
Universität Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend

ehemaliger

Direktor : Professor Dr.med. Gotthard S c h e t t l e r

Untersuchungen zur klärungsinduzierenden Wirkung
eines natürlichen Heparinoids

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulrich S c h u l z

aus Pritzwalk

Dekan: Professor Dr.med. Hans Heinz N a u m a n n
Referent: Professor Dr.med. Gotthard S c h e t t l e r
Korreferent: Professor Dr.med. Hans-Joachim D u l c e



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 19. 3. 1969

Inhalt

	Seite
1. Einführung	4
2. Klärfaktor	4
2.1. Vorkommen	4
2.2. Gewinnung	5
2.3. Physiko-chemische Eigenschaften	6
2.4. Substrat des Klärfaktors	7
3. Klärungsinduzierende Substanzen	9
3.1. Heparinoide	9
3.2. Duodenalheparinoid	12
3.2.1. Physiko-chemische Eigenschaften und Struktur von Duodenalhepa- rinoid	12
3.2.2. Biologische Wirksamkeit von Duodenalheparinoid. Ergebnisse klinischer Untersuchungen	14
4. Eigene Untersuchungen	21
4.1. Fragestellung	21
4.2. Methodik	21
4.3. Auswertung	25
4.4. Versuchsergebnisse	27
4.5. Diskussion	32
4.6. Zusammenfassung	39
Tabellen und Abbildungen	40
Literaturverzeichnis	51

1. Einführung

HAHN fand im Jahre 1943 zufällig, daß bei Hunden eine alimentäre Lipämie nach intravenöser Injektion von Heparin schnell verschwindet. Dieser Effekt wurde in der Folgezeit von vielen Untersuchern bestätigt und weitgehend aufgeklärt. Neben Heparin wurden andere Substanzen gefunden, die ebenfalls imstande sind, eine alimentäre Lipämie zu beseitigen. Durch Zusatz von Heparin zu lipämischem Plasma konnte HAHN in vitro keine Klärung des lipämisches-trüben Gemisches auslösen. Die erste in-vitro-Klärung gelang ANDERSON und FAWCETT (1950) durch Mischung lipämischen Plasmas mit Serum, das nach intravenöser Injektion von Heparin gewonnen wurde. LINDGREN und Mitarb.(1952) sahen am Boden ihrer Reaktionsgefäße nach Ablauf einer Klärreaktion Niederschläge, die sich als Calciumoleat erwiesen. Das veranlaßte diese Untersucher zu der Vermutung, daß während des Klärungsprozesses eine Triglyceridhydrolyse erfolge. 1952 wiesen NICHOLS und Mitarb. durch Titration nach, daß während der Klärung lipämischen Plasmas freie Fettsäuren auftreten. Da die Zunahme der freien Fettsäuren in einem Gemisch von lipämischem Plasma und Postheparinserum der Klärung, gemessen am Abfall der optischen Dichte des Plasmas und der Abnahme der Triglyceride, parallel geht, wird die Klärung als Effekt der Triglyceridhydrolyse angesehen (GROSSMAN u.Mitarb.1955).

2. Klärfaktor

Während Heparin - zu lipämischem Plasma hinzugefügt - keine Klärung des Gemisches herbeiführt, tritt in vitro eine Klärreaktion ein, wenn lipämisches Plasma mit Postheparinserum gemischt wird (ANDERSON u. FAWCETT 1950). Postheparinserum ist Serum, das nach intravenöser Injektion von Heparin gewonnen wurde. Nach der Injektion von Heparin tritt also im zirkulierenden Blut eine Substanz auf, die klärwirksam ist. Diese Substanz ist der sog. "Klärfaktor".

- 2.1. Vorkommen des Klärfaktors: Der Klärfaktor konnte in vielen Organen nachgewiesen werden: ANFINSEN und Mitarb.(1952) fan-

den Klärfaktor in Pylorusmagen, Herz und Lungen. KORN wies ihn in Niere, Milz und Aorta (1955) sowie in Skelettmuskel nach (1958). Mittels Heparindurchströmung konnte JEFFRIES (1954) bei Ratten Kläraktivität aus der isolierten hinteren Extremität, aus Haut und Subcutangewebe, aus den Viscera des Pfortadergebietes und aus der Lunge freisetzen. Besonders interessant waren die Versuche von ROBINSON (1960): Wird Kaninchen Heparin in die Femoralarterie injiziert, so erscheint gleichzeitig mit dem Auftreten des Heparins auch Kläraktivität im Femoralvenenblut. Das Fehlen einer Latenz des Wirkungseintritts läßt möglich erscheinen, daß der Angriffspunkt des Heparins die Gefäßwand ist. In gleicher Weise können die Ergebnisse von ROBINSON u. Mitarb. (1959) gewertet werden, bei denen bereits 30 Sec. nach der Injektion von Dextransulfat Kläraktivität auftrat.

Normalerweise läßt sich im Nüchternblut des Menschen kein Klärfaktor nachweisen (NIKKILÄ 1953). ENGELBERG (1954) fand bei Versuchspersonen mit besonders niedrigen Lipoproteidwerten des Nüchternserums Klärfaktor ohne vorangegangene Heparininjektion. Bei Ratten führte forcierte Fütterung mit Olivenöl zu einem Anstieg der endogenen Kläraktivität (ROBINSON u. Mitarb. 1954).

2.2. Gewinnung des Klärfaktors

Die erste Anreicherung des Klärfaktors gelang mit der COHN'schen Kälte-Äthanol-Fraktionierung. Die Präcipitation des Klärfaktors bei pH 5-6 und niedriger Ionenstärke führte zu einer 22-fachen Anreicherung (NIKKILÄ 1953). Durch fraktioniertes Aussalzen einer nach NIKKILÄ angereicherten Klärfaktorlösung mit Ammonsulfat bei 0 Grad Celsius und pH 5,7 erzielten HOLLET und MENG (1956) eine 1 480-fache Konzentration. Werden dem klärfaktorhaltigen Postheparinplasma Chylomikronen hinzugefügt, so ist der Klärfaktor nach Zentrifugieren in der flottierten Fettschicht enthalten. Wird aus dieser abgenommenen Schicht das Fett mit Heptan in der Kälte extrahiert, erreicht man

100 bis 200-fache Konzentration (ANFINSSEN u. QUIGLEY 1953). NIKKILÄ u. PESOLA (1956) konnten durch quantitative Adsorption des Klärfaktors an Calciumphosphatgel und anschließendes Auswaschen mit 0,1 m Citratlösung eine 40-fache Konzentration erreichen.

2.3. Physiko-chemische Eigenschaften des Klärfaktors:

Die Annahme, daß der Klärfaktor ein Proteid sei, stützt sich auf seine folgenden charakteristischen Eigenschaften: Klärfaktor ist nicht dialysierbar. Er ist hitzelabil, denn 3-minütiges Erhitzen auf 60° C führt zu seiner vollständigen Inaktivierung. Ebenso tritt Inaktivierung des Klärfaktors unter Einwirkung von Chymotrypsin und hohen Salzkonzentrationen ein (ANFINSSEN u. Mitarb. 1952, SCHÖLL u. SCHETTTLER 1961).

In der Störkeelektrophorese bei pH 7,2 wandert der Klärfaktor mit den α_2 -Globulinen. Die COHN'sche Kälte-Äthanol-Fraktionierung der Plasmaproteine läßt die größte Kläraktivität in der Fraktion III-1,2,3 erkennen. In der Ultrazentrifuge zeigt der Klärfaktor ein den Globulinen ähnliches Verhalten (GRAHAM et al. 1951, SCHÖLL u. SCHETTTLER 1961).

Das Wirkungsoptimum des Klärfaktors im Serum liegt bei pH 7,3 bis 7,5. Gereinigter Klärfaktor hat sein Optimum bei pH 8,5 (HOLLET u. MENG 1956).

Mit Schwermetallen und Protamin gibt er schwerlösliche Niederschläge.

Etliche Substanzen hemmen den Klärfaktor in vitro: Protamin (über 5×10^{-3} m), Triton, Salzkonzentrationen über 0,2 m, Heparin (über 4×10^{-6} m) (BROWN u. Mitarb. 1953) sowie Heparinoide, Äthylendiamintetraacetat, Pyrophosphat, Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600), Diisopropylfluorophosphat, synthetische Detergentien, Gallensalze, Schwermetalle (KORN 1958).

Durch diese Eigenschaften ist der Klärfaktor charakterisiert und gegen die übrigen Lipasen abgrenzbar.

2.4. Substrat des Klärfaktors

Substrat des Klärfaktors sind in erster Linie die Triglyceride der Chylomikronen.

Das mit der Nahrung aufgenommene Fett wird zum größeren Teil unter Einwirkung der Pankreaslipase in Di- und Monoglyceride sowie freie Fettsäuren und Glycerin gespalten, wobei Gallensäuren, freie Fettsäuren, Di- und Monoglyceride durch ihre emulgierende Wirkung die Hydrolyse beschleunigen. Die im Darm entstehende Fettemulsion enthält Triglyceridteilchen mit einem Durchmesser von weniger als $0,5\mu$, die ohne vorherige Spaltung direkt resorbiert werden können. Es kommen also feinstverteilte ungespaltene Neutralfette, Di- und Monoglyceride, freie Fettsäuren und Glycerin zur Resorption. In der Darmwand erfolgt eine Resynthese von Neutralfetten aus Glycerin und freien Fettsäuren (FRAZER 1940, FREDRICKSON u. GORDON 1958). Nach der Resorption gelangen die Fette mit langkettigen Fettsäuren (Kettenlänge größer als 14 C-Atome) über die Chylusgefäße und den Ductus thoracicus in die Blutbahn, die Fette mit kurz- bzw. mittelkettigen Fettsäuren (Kettenlänge unter 14 C-Atomen) über die Pfortader direkt in die Leber (BLOOM u. Mitarb. 1951). Die nach einer Fettmahlzeit im Serum auftretende Trübung wird von den in Form von Chylomikronen vorliegenden Neutralfetten verursacht. Chylomikronen sind Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 0,5 bis $1,0\mu$, die zum größten Teil aus Triglyceriden und nur geringen Mengen anderer Lipide bestehen. Ihr Eiweißgehalt ist gering. Die Lipidzusammensetzung der Chylomikronen pathologischer Hyperlipidämien weicht von der bei normaler alimentärer Lipämie ab (SWANK u. WILMOT 1951, SCHETTLER u. JOBST 1958). Die Chylomikronen sind die leichtesten und größten der "low density lipoproteins". Sie wandern in der freien und in der Stärkeelektrophorese im Bereich der α_2 -Globuline (SWAHN 1953, SCHETTLER u. Mitarb. 1955). Chylomikronen treten auf, wenn der Neutralfettgehalt des Plasmas 20 mg/l veresterte Fettsäuren übersteigt (AL-

BRINK u.Mitarb. 1955). Sie sind im Dunkelfeldmikroskop sichtbar, und ihre Zahl ist durch Auszählen bestimmbar (JOBST 1955). Weitere Möglichkeiten der quantitativen Erfassung einer Lipämie bzw. des Ausmaßes einer Klärungsreaktion bestehen in der photometrischen Bestimmung der Plasmatrübung (GROSSMAN 1954) sowie in der chemischen Analyse der bei der Triglyceridhydrolyse auftretenden Veränderungen: Abfall der Konzentration der Triglyceride, Anstieg der Konzentration der freien Fettsäuren und des nichtveresterten Glycerins.

Unter Einwirkung des Klärfaktors nehmen Zahl und Größe der Chylomikronen rasch ab (SWANK u. WILMOT 1951). Das vor Ablauf dieser Reaktion trübe lipämische Serum wird klar. Während der Klärung kommt es zu einem Anstieg der freien Fettsäuren (NICHOLS u.Mitarb. 1952), der der Klärung - gemessen am Abfall der optischen Dichte des Serums und an der Abnahme der Triglyceride - parallel geht (GROSSMAN u.Mitarb. 1955). Danach kann man die Klärung als eine Folge der Triglyceridhydrolyse ansehen. Während der Klärfaktor die Triglyceride der Chylomikronen spaltet, findet bei seiner Einwirkung auf Triglyceridlösungen in vitro nur eine minimale Hydrolyse statt. Wird dagegen die Triglyceridlösung in vitro zunächst mit Normalserum inkubiert, werden die Triglyceride vom Klärfaktor ebenso rasch gespalten wie Chylomikronen. Die Inkubation von Triglyceriden mit Normalserum führt zur Bildung stabiler Triglycerid-Proteinkomplexe (mit α - und β -Lipoproteiden des Serums).

Chylomikronen liegen im Flotationsspektrum der Ultrazentrifuge in der S_f -Skala bei Werten von S_f 70 bis S_f von mehreren Tausend. Diese Teilchen verschwinden während der Klärungsreaktion völlig aus dem Substrat. Daneben verschwinden bzw. werden erheblich dezimiert auch die Teilchen mit S_f -Werten über 10 (GRAHAM et al.1951, SHORE 1955). Somit stellen auch β -Lipoproteide - ihre S_f -Werte liegen bei 0 - 10, 10 - 20 sowie z.T. 400 - ein natürliches Substrat des Klärfaktors dar. Der Klärfaktor hydrolysiert also Triglyceride der Chylomikronen, Triglycerid-Proteid-

komplexe, die durch Inkubation von Triglyceriden mit Normalserum gewonnen werden, sowie β -Lipoproteide niedriger Dichte. Aufgrund dieses Verhaltens, durch das sich der Klärfaktor von der Pankreaslipase unterscheidet, gab ihm KORN (1956) den Namen Lipoproteidlipase.

3. Klärungsinduzierende Substanzen

Eine in-vivo-Klärung lipämischen Serums führen neben Heparin auch etliche andere Substanzen herbei: Die dem Heparin konstitutionell verwandten Manuronate (Natrium-Polyanhydromannuronsäuresulfat) (CONSTANTINIDES u.Mitarb. 1954) und Fucoidin (SCHULER u. SPRINGER 1957) sind in vivo antilipämisch wirksam und führen nach Injektion zur Freisetzung von Klärfaktor. Ebenfalls in vivo antilipämisch wirksam sind Colchicin, Desacetylmethylcolchicin (Colcemid) und Lipopolysaccharidfraktionen aus Gram-negativen Bakterien (SCHULER u.Mitarb. 1957) sowie Largactil (HOLLISTER u. KANTER 1955, KOVACS u.Mitarb. 1956, SCHULER u. Mitarb. 1957). Bei den letztgenannten Substanzen konnten SCHULER u.Mitarb. (1957) keine Freisetzung von Klärfaktor finden. Die experimentelle Prüfung verschiedener möglicherweise erscheinender Mechanismen durch diese Autoren führte zu negativen Ergebnissen. Der Mechanismus der Klärwirksamkeit dieser Präparate blieb zunächst unbekannt. KOVACS u.Mitarb. (1956) führen die klärungsinduzierende Wirkung von Chlorpromazin auf eine Mobilisierung von Heparin zurück, weil der Kläreffekt bei alimentär-lipämischen Hunden unmittelbar nach der intravenösen Substanzinjektion einsetzte und mit Protaminsulfat hemmbar war.

3.1. Heparinoide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind die sog. Heparinoide von speziellem Interesse. Dabei handelt es sich um Substanzen, die dem Heparin in Struktur und physiko-chemischen Eigenschaften nahestehen.

GORE und LARKEY (1959) extrahierten aus menschlichen Aorten die sauren Mukopolysaccharide. Bei der weißen Ratte

zeigten diese Extrakte dem Heparin gleiche antikoagulatorische Eigenschaften sowie dessen Aktivität hinsichtlich der Freisetzung des Lipidklärfaktors. In einem sauren Mukopolysaccharid, das aus Rinderaorten gewonnen worden war, wurden als Bestandteile Chondroitinsulfat A, Chondroitinsulfat B, Hyaluronsäure und Heparin identifiziert. Chondroitinsulfat B hatte die gleichen antikoagulatorischen und antilipämischen Eigenschaften wie die aus menschlichen Aorten isolierten sauren Mukopolysaccharide. Die Autoren führen deshalb die Wirksamkeit ihres Aortenextraktes auf dessen Gehalt an Chondroitinsulfat B zurück. SEIFTER und BAEDER (1954) berichteten, daß Hyaluronidase, partiell depolymerisierte Hyaluronidase und Desoxycorticosteron bei Ratten Klärfaktor freisetzen. Hyaluronsäure scheint den gleichen Effekt auszulösen, ist aber in der Wirkung schwächer. Auch bei Hunden wurde Klärfaktorfreisetzung durch partiell depolymerisierte Hyaluronidase und Hyaluronidase beobachtet. Partielle depolymerisierte Hyaluronidase ist im Gegensatz zu Heparin oral wirksam. Die subcutane Applikation von Hyaluronidase bewirkt Klärfaktorfreisetzung wahrscheinlich über eine vorherige Freisetzung von partiell depolymerisierter Hyaluronsäure.

CAPRARO u.Mitarb. (1956) und CAPRARO und CANTONE (1958) gewannen aus normalem menschlichen Magensaft ein Muzinpräparat, nach dessen oraler Applikation bei Kaninchen eine aktivierende Wirkung auf das Klärvermögen des Plasmas festgestellt wurde. Dieselben Untersucher gewannen auch aus Magenschleimhaut des Schweines ein Muzinpräparat mit ähnlicher Wirksamkeit. Aus diesem Extrakt konnten sie eine fast reine Substanz isolieren, die hinsichtlich Klärwirksamkeit nach peroraler Applikation bei Kaninchen bereits mit einem Zehntel der Dosis des Ausgangspräparates den gleichen Effekt bewirkte. Diese Substanz ist ein saures Aminopolysaccharid mit hohem Gehalt an Hexuronsäure und Glukosamin sowie Spuren von Schwefel, welches als eine der Hyaluronsäure ähnliche Verbindung

angesehen wurde.

CANTONE u. Mitarb. (1959) berichteten ebenfalls über ein aus menschlichem Magensaft erhaltenes Muzinpräparat, das nach peroraler Applikation bei Kaninchen während in vitro Klärversuchen zu einem leichten und vorübergehenden aber signifikanten Anstieg der Plasmaklärreaktion führte. Diese Substanz klärt nach oraler Applikation das Serum von Kaninchen, die mit Ediol hyperlipämisch gemacht wurden. Außerdem hat diese Substanz einen Schutzeffekt gegen alimentär bedingte Leberverfettung bei Ratten. Der aus dem ursprünglichen Muzinpräparat mit Cetyltrimethylammoniumbromid isolierte Niederschlag hat dieselben Eigenschaften. Aufgrund dieser Präcipitationsreaktion und der Tatsache, daß die präcipitierte Fraktion mit Toluidinblau eine metachromatische Färbung ergibt, vermuten die Autoren, daß das Material ein saures Aminopolysaccharid enthält. Dieselben Autoren isolierten aus der Schleimhaut von Schweinemägen eine Substanz, bei der es sich wegen des hohen Gehaltes an Hexuronsäure und Hexosamin und des Fehlens von Schwefel wahrscheinlich um ein nicht sulfuriertes saures Aminopolysaccharid handelt. Die Substanz hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 5000, zeigt bei der Elektrophorese eine Wanderung zur Anode, ist mit Cetyltrimethylammoniumbromid fällbar und ergibt mit Toluidinblau eine metachromatische Reaktion. Peroral appliziert bewirkt es bei durch Lipoidinjektion hyperlipämisch gemachten Kaninchen einen Kläreffekt sowie einen lipolytischen Effekt bei der alimentären Fettleber von Ratten.

Langdauernde Behandlung mit diesem Präparat zeigte bei cholesterinreich ernährten Kaninchen eine hypocholesterinämische Wirkung. Weitere Heparinoide wurden von JONES (1956) aus Hirngewebe und von BIANCHINI (1958) aus Pankreas gewonnen.

3.2. Duodenalheparinoid

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen ist ein Heparinoid, das BIANCHINI (1958) aus einem alkalischen Extrakt der Duodenalschleimhaut mittels eines Austauschharzes für Sulfongruppen (Merck, N 1 HSO_3) isolierte. Die Reindarstellung dieser Duodenalheparinoid genannten Substanz ermöglichte dann die Untersuchung der physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften und Vergleiche mit Heparin und Chondroitinsulfat.

3.2.1. Physiko-chemische Eigenschaften und Struktur von Duodenalheparinoid

Elektrophoretische Untersuchungen (Durrum-Apparat, Whatmann 3 MM Papier, Boratpuffer pH 8,6) ergaben, daß die Wanderungsgeschwindigkeit des Duodenalheparinoids niedriger ist als die von Heparin und Chondroitinsulfat. Im Elektropherogramm finden sich zwei zur Anode wandernde Banden, die sich intensiv mit Toluidinblau anfärben. Die schnellere Komponente "A" stellt ein sulfoniertes Polysaccharid dar, während die langsamere Komponente "B" aus Aminosäuren besteht. Außerdem ist immer eine mehr oder weniger große Menge von Substanz "C" vorhanden, die ninhydrinpositiv reagiert und nahe am Startpunkt nachweisbar ist.

Duodenalheparinoid ist nicht dialysierbar.

Mit Toluidinblau gibt es metachromatische Reaktion, deren Intensität geringer ist als die von Heparin und Chondroitinsulfat. Die spektrophotometrische Analyse der Farbreaktion mit Toluidinblau zeigte, daß die Transmissionskurven für Duodenalheparinoid und Chondroitinsulfat einander sehr ähnlich sind, während sich die des Heparins deutlich davon unterscheidet.

Die Toluidinblausättigungskurven für Heparin, Chondroitinsulfat und Duodenalheparinoid sind verschieden. Das Bindungsvermögen des Duodenalheparinoids für Toluidinblau ist nämlich geringer als das der beiden anderen Substanzen. Um den Sättigungspunkt des Duodenalhepa-

rinoids zu erreichen, benötigt man nur $1/9$ der für Heparin und $1/5$ der für Chondroitinsulfat erforderlichen Menge Toliudinblau. Das weist auf den geringeren Gehalt des Duodenalheparinoids an Sulfongruppen hin.

Der Hexuronsäuregehalt, bestimmt nach der Carbazolmethode, beträgt beim Duodenalheparinoid $40\mu\text{g}/\text{mg}$, beim Chondroitinsulfat $260\mu\text{g}/\text{mg}$ und beim Heparin $310\mu\text{g}/\text{mg}$.

Hexuronsäure, Hexosamin und SO_3H -Gruppen sind im Heparinoid im Verhältnis 2:1:3 vorhanden.

Die Komponente "A" enthält $312\mu\text{g}$ Hexuronsäure und $50\mu\text{g}$ Hexosamin/mg.

Die Zusammensetzung der Komponente "B" wurde nicht eindeutig geklärt. Diese Fraktion enthält etliche Aminosäuren, nämlich Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin (oder Arginin), Leucin, Isoleucin, Valin, Tryptophan, Alanin und möglicherweise Threonin.

Die Komponenten "A" und "C" stellen die Hauptbestandteile des Duodenalheparinoids dar. Der Anteil von "C" beträgt etwa 87 %, der von "A" etwa 13 %.

Der Gehalt des Duodenalheparinoids an $-\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen beträgt 125 bis 127 $^{\circ}/_{\text{oo}}$.

Duodenalheparinoid besitzt Affinität zu basischen Farbstoffen, mit denen es unlösliche Komplexe bildet. Mit Rivanol präcipitiert es quantitativ, wobei die intensive gelbe Fluoreszenz des Rivanols unter einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 270 nach 250 $\text{m}\mu$ verschwindet.

Komplexe, wie die mit Toluidinblau, erscheinen in Faserform und zeigen im Polarisationsmikroskop Doppelbrechung und Parakristallbildung.

Duodenalheparinoid präcipitiert auch mit anderen basischen Substanzen, wie z.B. mit Octylamin, Protamin und quarternären Ammoniumbasen.

Aus wässrigen Lösungen kann es mit Aceton und Äthanol gefällt werden. Bei sorgfältiger Arbeitsweise und unter Verwendung reiner Lösungsmittel erhält man aus Aceton-Wasser-Lösungen Mikrokristalle in verästelter oder Roset-

tenform mit gut konturierten, sechsflächigen Strukturen, die häufig Rhomboidform aufweisen.

Das Absorptionsspektrum von Duodenalheparinoid zeigt ein Maximum bei 204 $m\mu$ und einen geringen Anstieg bei 260 $m\mu$. Das Infrarotspektrum ist dem des Heparins sehr ähnlich mit Ausnahme zweier Gipfel in Nachbarschaft des die COO-Gruppe charakterisierenden Gipfels. Das deutet darauf hin, daß eine Karbonyl- und eine Amino-Gruppe vorhanden sind.

Reines Duodenalheparinoid ist sehr hygroskopisch. An der Luft verliert es unter Feuchtigkeitsaufnahme alle ihm eigentümlichen biochemischen und biologischen Eigenschaften.

BIANCHINI (1961) klassifizierte das Duodenalheparinoid aufgrund der elektrophoretischen, kristallographischen, optischen und biochemischen Eigenschaften und seines färbereichen Verhaltens als ein Sulfomukopolysaccharid, in welchem die Aminogruppe des Hexosamins mit einer Acetylgruppe verestert ist. Diese Substanz wurde inzwischen unter dem Namen "Ateroid" in den Handel gebracht.

3.2.2. Biologische Wirksamkeit von Duodenalheparinoid. Ergebnisse klinischer Untersuchungen.

Das klinische Interesse am Duodenalheparinoid beruht auf seiner von etlichen Autoren angegebenen Fähigkeit, regulierend in den Lipidstoffwechsel einzugreifen, wobei im Gegensatz zu Heparin orale Wirksamkeit gefunden wurde bei fehlender bzw. nur geringer Intensität antikoagulatorischer Eigenschaften.

BIANCHINI (1961) fand bei Kaninchen nach Gabe von Duodenalheparinoid keine Veränderung der Prothrombinzeit bzw. 1/5 der Wirksamkeit des Heparins in Bezug auf Prothrombinzeitverlängerung.

Bei den mit oralen Gaben von Duodenalheparinoid behandelten Versuchspersonen von POLTRONIERI u. Mitarb. (1959) zeigten sich keine Veränderungen folgender Blutgerinnungswerte: Gerinnungszeit (nach LEE-WHITE), Quickzeit,

Calciumzeit (nach HOWELL). Auch der Heparintoleranztest wurde von dem Präparat nicht beeinflusst. Ebenso blieben bei den 26 Patienten von SABELLA und DE SIMONE (1960), die 30 Tage lang mit der gleichen Substanz behandelt wurden, Blutungs-, Gerinnungs- und Retraktionszeit konstant.

Nach BIANCHINI (1961) ist Duodenalheparinoid säurelabil und wird durch die Magensalzsäure teilweise zerstört. AZZENA u. Mitarb. (1959) meinen dagegen, daß die Substanz durch Magen- und Darmsaft nicht inaktiviert werde.

Bei oraler Applikation beginnt die Ausscheidung des Duodenalheparinoids im Harn drei Stunden nach der Einnahme. Das Ausscheidungsmaximum liegt zwischen der sechsten und der achten Stunde; vollständige Exkretion ist nach acht bis zehn Stunden erreicht (POLTRONIERI 1959). Annähernd damit übereinstimmend zeigten die Untersuchungen von BIANCHINI (1961) den Beginn der renalen Ausscheidung eine Stunde nach oraler Verabreichung der Substanz und vollständige Exkretion nach neun bis zehn Stunden.

Duodenalheparinoid senkt die Blutviskosität. Dieser Effekt wurde von BIANCHINI (1959) in klinischen Untersuchungen gefunden und darauf zurückgeführt, daß der Lipoidgehalt des Plasmas verändert sowie der Stoffwechsel der Erythrocyten unter Veränderung ihrer morphologischen Struktur beeinflusst wird.

Bei Versuchen an Ratten fand BIANCHINI (1961), daß intravenöse und intraperitoneale Injektion von Duodenalheparinoid Freisetzung von Klärfaktor bewirkt. Plasma derart behandelter Tiere ist nämlich zur Lipolyse eines hinzugefügten Lipoidsubstrates befähigt. Die intravenöse Schwellendosis beträgt 15 bis 20 μ g/200 g Ratte. Der Prozeß der Klärfaktorfreisetzung verläuft wie nach Heparinapplikation. Das Maximum der Klärfähigkeit wird 4 min nach intravenöser und 60 bis 70 min nach intraperitonealer Injektion erzielt. Die anschließend zunächst abnehmende Kläraktivität endet eine Stunde

nach intravenöser und vier Stunden nach intraperitonealer Gabe. Intravenös verabfolgtes Heparinoid bewirkt eine stärkere, kurzfristige Klärfaktorfreesetzung, während nach intraperitonealer Instillation bei längerer Dauer eine niedrigere Aktivität erreicht wird. Die Gesamtmenge freigesetzten Klärfaktors soll eine logarithmische Funktion der verabfolgten Heparinoiddosis sein. BIANCHINI (1961) konnte bei oraler Applikation des Duodenalheparinoids die Klärfaktormobilisierung nicht sicher beweisen. Es fand sich aber bei den mit Duodenalheparinoid behandelten Tieren eine sichere Schutzwirkung für den Klärfaktor gegen die durch Triton bedingte Inhibition: Die intravenöse Injektion von Triton führt bei Ratten zum Anstieg von Trübung und Viskosität des Plasmas, Anstieg der Gesamtlipide und des Cholesterins, Abfall des Veresterungsindex von Cholesterin, Reduktion der Heparin-bedingten Klärfaktorfreesetzung, Veränderung der Lipoproteidwerte und des Fettsäuremusters. Die intravenöse oder intraperitoneale Verabfolgung von Duodenalheparinoid an mit Triton behandelte Tiere führt zu gegensinnigen Reaktionen mit Abfall der Lipämie und der Cholesterinämie.

PERUZY und SERENO (1957) bestimmten bei acht Patienten mit deutlichen Zeichen einer Arteriosklerose 6 Minuten, 30 Minuten und 3 Stunden nach Gabe einer Fettmahlzeit die Serumlipoproteide und fanden einen Anstieg des β/α -Lipoproteidquotienten um 13 bzw. 37 %. Die Wiederholung des Tests nach einwöchiger oraler Ateroidbehandlung zeigte einen Anstieg des β/α -Lipoproteidquotienten um nur 15 bis 16 % während des ganzen Tests. Bei zwei einer Langzeitbehandlung unterzogenen Patienten fanden die gleichen Autoren unter der oralen Ateroid-Gabe einen zunehmenden Abfall der β -Lipoproteide, des β/α -Lipoproteidquotienten sowie eine geringe Reduktion der Cholesterinkonzentration.

RACCA und Mitarb. (1960) sahen bei 30 Patienten mit arteriosklerotischen Krankheitsbildern nach 30-tägi-

ger oraler Ateroid-Behandlung in 70 % der Fälle einen Abfall des β/α -Quotienten, dessen Normalisierung auch noch 30 Tage nach Abschluß der Behandlung bestand.

MASTROGIOVANNI (1960) behandelte 39 neurologisch kranke Patienten mit oralen Ateroid-Gaben. Die blutochemischen Kontrollen ergaben in fast allen Fällen einen starken und bleibenden Abfall der β -Lipoproteide. Ähnlich, aber geringer sanken die Cholesterinwerte.

Bei 18 arteriosklerotischen Patienten mit Prostatohypertrophie fand CHIANTA (1960) nach 30-tägiger oraler Ateroid-Behandlung in allen Fällen eine Verminderung der Gesamtcholesterinkonzentration von durchschnittlich 308 mg% auf 243 mg% sowie einen Abfall des β/α -Lipoproteidquotienten um durchschnittlich 35 %. Die gefundene Normalisierung der Lipidwerte führten die Autoren auf eine Stimulierung der Lipoproteidlipase zurück.

34 Patienten mit isolierten oder multiplen peripheren arteriosklerotischen Gefäßverschlüssen wurden von GUAGLIANO und Mitarb. (1960) 45 Tage lang mit Ateroid, z.T. in Kombination mit Gangliektomie, behandelt. Neben subjektiven und objektiven Besserungen der Krankheitsbilder zeigte sich ein markanter Rückgang der Cholesterinämie.

BENEDETTI u.Mitarb. (1959) gaben 17 Patienten mit Coronarsklerose 13 Tage lang Ateroid per os. Bei allen Fällen - mit einer Ausnahme - ergab sich eine durchschnittliche Reduktion des Cholesterinspiegels um 53 mg% und des β/α -Lipoproteidquotienten von 3,5 auf 2,8.

AZZENA u.Mitarb. (1959) behandelten 15 Patienten mit Hyperlipämie bei frischem Myocardinfarkt, Herzinsuffizienz, coronaren Durchblutungsstörungen u.a. über 22 Tage mit Ateroid in oraler Applikation. Dabei fanden sie am Ende der Behandlung einen durchschnittlich 45%igen Abfall des anfangs anormal hohen β/α -Lipoproteidquotienten. Die Serumlipoproteidanalyse mittels Ultrazentrifuge zeigte, daß die "low density"-Lipoproteine

am empfindlichsten reagierten gegenüber nur geringen Veränderungen der anderen Lipoproteide. 15 Tage nach Abschluß der Behandlung aber war eine Tendenz zur Rückkehr zu den pathologischen Ausgangswerten zu erkennen.

GALLO u. SERRA (1960) erreichten bei 30 arteriosklerotischen Patienten im Vergleich mit einem 30-köpfigen Kontrollkollektiv mittels 30-tägiger Ateroid-Behandlung eine signifikante Verminderung des Gesamtcholesterinspiegels.

Bei 36 arteriosklerosekranken Patienten von SABELLA u. DE SIMONE (1960) senkte eine 30-tägige orale Ateroid-Behandlung die Cholesterinwerte um durchschnittlich 29 %. Der mittlere Ausgangswert des β/α -Lipoproteidquotienten von 5,9 wurde auf 3,8 reduziert. 30 Tage nach Abschluß der Behandlung hatten die wieder ansteigenden Cholesterinwerte das Ausgangsniveau in einigen Fällen noch nicht wieder erreicht. Die β/α -Lipoproteidquotienten lagen - mit einer Ausnahme - immer noch unter den Initialwerten.

NIKROSINI u. PICCINELLI (1959) behandelten 22 Patienten mit veränderten Serumlipoidwerten 20 Tage lang mit Ateroid. Sie fanden einen Abfall des Gesamtcholesterins von durchschnittlich 621 auf 526 mg% und eine Verminderung der Glyceride von durchschnittlich 160 auf 102 mg%. Die Phosphatide nahmen absolut und relativ zu. Der Phosphatid-Glycerid-Quotient stieg von 1,15 auf 2,06 an.

ANTONINI u. SORDI (1961) behandelten ihre 60 hyperlipämischen Versuchspersonen durchschnittlich drei Wochen lang mit oralen Ateroid-Gaben. Die Bestimmung des Cholesterins ergab vier verschiedene Reaktionstypen: 1. Progredienter Abfall der Cholesterinwerte (60 % der Fälle), 2. Konstanz der Cholesterinämie (30 %), 3. Initialer Abfall des Cholesterins mit nachfolgendem Anstieg und 4. Initialer Anstieg mit nachfolgendem Abfall (zusammen 10 %). In 40 Fällen wurden die Veränderungen des Cholesteringehaltes der β -Lipoproteide ver-

folgt. Bei 67 % dieser Fälle fand sich ein Abfall desselben, während der Cholesteringehalt der α -Lipoproteide kaum verändert wurde. Der in 40 Fällen bestimmte β/α -Lipoproteidquotient zeigte bei 67 % der Versuchspersonen einen Abfall von durchschnittlich 37 % nach vier Wochen dauernder Behandlung. Zur Feststellung einer eventuell sofort einsetzenden Wirkung von Ateroid wurden 15 Versuchspersonen auf einmal je 10 Kapseln mit je 10 mg Substanz verabreicht. Sechs Minuten sowie drei Stunden nach der oralen Applikation entnommenes Serum wurde ohne Substratzusatz bei 37° C für 1 bzw. 3 Stunden inkubiert. Dabei zeigte sich ein unterschiedlicher, manchmal erheblicher Anstieg der freien Fettsäuren. Im gleichen Versuch ohne Inkubation (7 Fälle) wurde keine Steigerung der lipolytischen Aktivität des Postateroidserums gefunden.

Bei 7 Versuchspersonen wurden im Anschluß an eine Fettmahlzeit von 100 g Sahne Gesamtcholesterin, β/α -Lipoproteidquotient, Gesamtlipoide und optische Trübung gemessen. Der Wiederholungstest nach 15-tägiger oraler Ateroid-Behandlung zeigte nur in einigen Fällen einen Abfall der optischen Trübung, des β/α -Quotienten und der Gesamtlipoide. Die ebenfalls vorgenommenen Klärfaktoruntersuchungen ergaben weder eine spontane Kläraktivitätssteigerung noch eine solche nach Standardheparininjektion.

Die gleichen Autoren gaben zwei Versuchspersonen ^{131}J -markiertes Olivenöl oder Triolein und bestimmten danach die Radioaktivität des Gesamtserums, der β -Lipoproteide und der α -Lipoproteide. Die Wiederholung des Versuches nach vier Tagen, diesmal mit gleichzeitiger Ateroid-Gabe (10 Kapseln zu 10 mg), zeigte eine vollständige Resorption der angebotenen Fette. Der Stoffwechsel der resorbierten Fette war sogar deutlich beschleunigt, da eine niedrigere Radioaktivität der Gesamt-Lipoproteide und der β -Lipoproteide gefunden wurde.

POLTRONIERI u. Mitarb. (1959) erreichten bereits 2 Std. nach einmaliger oraler Gabe von 40 mg Ateroid bei 6 Patienten einen Abfall der turbidimetrisch bestimmten

Lipämie um 15 bis 30 %. Dieselben Verfasser schlossen aus drei untersuchten Fällen, daß das Maximum des gefundenen Cholesterinabfalls nach einmaliger oraler Ateroid-Gabe in Bezug auf Ausmaß und Zeitpunkt des Auftretens dosisabhängig sei. Sie sahen bei zwei Patienten mit besonders niedriger Lipämiekläraktivität einen rapiden Anstieg derselben nach Gabe von 5 Tabletten Ateroid (Ateroidgehalt je Tablette 10 mg).

Nach einer Fettmahlzeit kommt es zu einem Abfall der Kläraktivität des Plasmas in Parallelität zum Trübungsablauf. Entsprechend dem Trübungsmaximum nach vier Stunden besteht ein Kläraktivitätsminimum mit nachfolgender Normalisierung zum selben Zeitpunkt. Bei gleichzeitiger Einnahme des Duodenalheparinoids und der Fettmahlzeit stieg dagegen die Kläraktivität etwas über die Ausgangswerte an. Bei vier Patienten sahen die genannten Autoren drei Stunden nach Fettmahlzeit und gleichzeitiger Ateroid-Gabe einen durchschnittlich 15 bis 30%igen Abfall des β/α -Lipoproteidquotienten gegenüber den Werten nach Fettmahlzeit ohne Ateroid.

PERUZY u. SERENO (1957) unterteilten 42 Patienten mit hohen Cholesterin- und Lipämiewerten nach klinischen Krankheitsbildern und nach Applikationsart des Duodenalheparinoids in drei Gruppen. Sie fanden in allen Gruppen nach 30- bis 50-tägiger Behandlung mit täglich 20 bis 40 mg Ateroid (intramuskulär oder peroral) signifikante Senkungen des Gesamtcholesterinspiegels und des β/α -Lipoproteidquotienten.

BIANCHINI (1961) gab in einer zusammenfassenden Arbeit an, daß nach der vorliegenden Literatur eine 30-tägige Behandlung mit Ateroid bei 171 klinischen Fällen einen Abfall der Serumtrübung, der Cholesterinämie, der Lipämie und bei 97 klinischen Fällen des β/α -Lipoproteidquotienten erzielte.

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Fragestellung

In den im vorangehenden Abschnitt angeführten Untersuchungen wurde als biologische Wirkung des Duodenalheparinoids Ateroid eine Effektivität im Lipoidhaushalt vornehmlich unter oraler Langzeitbehandlung nachgewiesen. Da sich in diesen Studien keine eindeutigen Anhaltspunkte für den Wirkungsmechanismus der Substanz ergaben, sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht werden, ob sich nach einmaliger Anwendung von Ateroid, d.h. im akuten Versuch, eine durch Ateroid bewirkte Klärfaktorfreesetzung bzw. -aktivierung nachweisen läßt, welche die beschriebene Beeinflussung der Serumtrübung bzw. des Serumtriglyceridgehaltes erklären könnte.

4.2. Methodik

Zur Feststellung einer Klärfaktorinduzierung wurden folgende Versuchsanordnungen gewählt:

- a) Es wurde geprüft, ob bei lipämischen Zuständen nach Ateroid-Zufuhr eine Senkung der Lipoidkonzentration eintritt.
- b) Es wurde untersucht, ob ein künstliches Triglyceridsubstrat bei Inkubation mit Serum, welches nach Applikation der Testsubstanz gewonnen wurde, geklärt wird.

Untersuchungen dieser Art wurden sowohl an Kaninchen als auch an Versuchspersonen durchgeführt.

Bei 12 Versuchspersonen wurde eine orale Fettbelastung durchgeführt. Dabei handelte es sich um männliche Probanden im Alter von 20 bis 52 Jahren. 7 Versuchspersonen waren gesund, die übrigen 5 waren Patienten. Bei letzteren lagen weder ein Diabetes mellitus oder eine andere mit symptomatischer Hyperlipämie einhergehende Erkrankung noch eine arteriosklerotische Symptomatik

vor. Die Probanden verzehrten morgens nüchtern 1 g Butter/kg Körpergewicht auf zwei Scheiben Brot. Blutentnahmen erfolgten vor sowie stündlich bzw. zweistündlich nach der Einnahme der Fettmahlzeit über einen Zeitraum bis zu 5 bzw. 6 Stunden. Die Versuchspersonen waren am Vorabend fettarm ernährt worden. Sie lagen während der Dauer des Versuches auf einem Ruhebett. Bei denselben Probanden wurde nach Ablauf einer Woche unter den gleichen Bedingungen die Fettbelastung wiederholt. Dabei erhielten sie jedoch unmittelbar vor der Fettaufnahme 100 mg Ateroid in säureresistenten Kapseln. Blutentnahmen erfolgten wie beim ersten Versuch. Die Blutproben aus Kontroll- (ohne Ateroid) und Testbelastung (mit Ateroid) wurden bis zur vollständigen Gerinnung und Retraktion im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Danach wurden sie 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Seren wurden abpipettiert, ihre Trübung wurde als Extinktion im Spektralphotometer PM Q II (ZEISS) bei einer Wellenlänge von 691 m μ , einer Schichtdicke von 1 cm und einer Temperatur von 25° C gemessen.

3 Versuchspersonen erhielten 10 mg Ateroid/kg Körpergewicht, eine Versuchsperson erhielt 25 mg Ateroid/kg Körpergewicht in säureresistenten Kapseln per os verabreicht. Blutentnahmen erfolgten vor der Ateroid-Einnahme sowie danach in stündlichen Abständen über verschiedenen lange Zeiträume (in einem Fall über 4, in zwei Fällen über 5 und in einem weiteren Fall über 8 Stunden). Die entnommenen Blutproben wurden bis zur vollständigen Gerinnung und Retraktion bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend bei 3000 U/min 10 min lang zentrifugiert. 1 ml des abpipettierten Serums jeder Probe wurde mit 0,4 ml einer 20%igen Lösung von Humanalbumin in physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Das Humanalbumin (Behringwerke) war 16 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet worden. Dieses Gemisch wurde 1 min bei 37° C inkubiert.

Darauf wurde 0,1 ml "Lipofundinsubstrat" zugegeben. Das Lipofundinsubstrat wurde nach SCHÖLL und KOPITZKI (1964) hergestellt auf der Basis der 10%igen Fettemulsion Lipofundin⁺: 1 Teil Lipofundin wurde mit einem Teil Normalserum gemischt und mindestens 30 min bei 37° C inkubiert zum Zwecke der Bildung von Triglycerid-Proteidkomplexen, die dem Klärfaktor als Substrat dienen. Das Gemisch wurde nach dieser Inkubation mit physiologischer Kochsalzlösung auf einen 1%igen Lipofundingegehalt verdünnt. Das Reaktionsgemisch - bestehend aus mit Humanalbuminlösung inkubiertem Untersuchungsserum und Lipofundinsubstrat - wurde in 1 cm Küvetten gegeben. Die Extinktion der Mischung wurde bei einer Wellenlänge von 691 m μ und einer Temperatur von 37° C in einminütigen Abständen fortlaufend über einen Zeitraum von 15 min bestimmt.

5 Probanden wurde wässrig gelöstes Ateroid in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht mittels Sonde intraduodenal instilliert. Venenblut wurde vor der Substanzverabreichung sowie danach über einen Zeitraum von 4 Stunden abgenommen (in 4 Fällen stündlich, in einem Fall halbstündlich). Die Blutproben wurden wieder bis zur vollständigen Gerinnung und Retraktion im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Nach anschließender Zentrifugation (10 min bei 3000 U/min) wurde von jeder Probe 1 ml Serum abpipettiert, mit 0,4 ml einer 20%igen Lösung von Humanalbumin in physiologischer Kochsalzlösung gemischt und 1 min bei 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Lipofundinsubstrat wurde das Reaktionsgemisch in Küvetten (d= 1 cm) gegeben und seine Extinktion bei einer Wellenlänge von 691 m μ und einer Temperatur von 37° C über Zeiträume von 15 bis 20 min fortlaufend bestimmt.

Bei sieben 2 bis 3 kg schweren Kaninchen wurde durch In-

⁺Hersteller B.Braun,Melsungen. Die Emulsion enthält 100 g Baumwollsaatöl, 50 g Sorbit und 15 g Phosphatide in 1000 ml Emulsion.

jektion von 4 ml/kg Körpergewicht der 10%igen Fette-
mulsion Lipofundin in die Ohrvene eine Lipämie erzeugt.
Blutproben wurden vor sowie 30, 60 und 120 min nach
der Injektion durch Punktion der Vene des anderen Ohres
gewonnen. Nach 10 bis 14 Tagen wurde denselben Tieren
die gleiche Fettmenge nochmals intravenös zugeführt.
30 min vor der Injektion erhielten sie aber 100 mg Ate-
roid/kg Körpergewicht per os. Die angebotenen Kapseln
wurden von den Tieren stets erst zerkaut und dann ge-
schluckt. Blutentnahmen erfolgten wiederum vor sowie
30, 60 und 120 min nach Injektion der Fette-
mulsion. Die Blutproben aus Kontroll- (ohne Ateroid) und Test-
belastungen (mit Ateroid) wurden bis zur vollständigen
Gerinnung und Retraktion bei 4° C im Kühlschrank auf-
bewahrt. Nach anschließender Zentrifugation (10 min bei
3000 U/min) wurde das überstehende Serum abpipettiert
und seine Trübung als Extinktion bei einer Wellenlänge
von 540 m μ einer Temperatur von 25° C und einer
Schichtdicke von 1 cm bestimmt.

Zum in-vitro-Nachweis einer klärungsinduzierenden Wir-
kung der Testsubstanz wurde 5 Kaninchen je 1 Ampulle
Ateroid (speziell für Tierversuche hergestellte Injek-
tionslösungen, welche pro Ampulle etwa 60 mg Substanz
enthielten) in die Ohrvene injiziert. Blutproben wurden
vor und 10 min nach der Injektion gewonnen und bis zur
vollständigen Gerinnung und Retraktion bei 4° C im Kühl-
schrank aufbewahrt. Von dem nach der Zentrifugation
(10 min bei 3000 U/min) überstehenden Serum wurde 1 ml
abpipettiert und mit 0,4 ml einer 20%igen Humanalbumin-
lösung in physiologischer Kochsalzlösung gemischt und
1 min bei 37° C inkubiert. Zu dem mit der Albuminlösung
inkubierten Testserum wurden 0,1 ml des Lipofundin-
substrates gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde in Küvetten
gegeben (d = 1 cm) und seine Extinktion bei 37° C und
540 m μ über einen Zeitraum von 60 min in 1 min Abstän-
den gemessen.

Zur Untersuchung wurde 10 min nach der Ateroid-Injektion entnommenes Serum verwendet, weil Vorversuche ergeben hatten, daß etwa 10 min post injectionem das Maximum der Kläraktivität erreicht wurde.

In einem der im zweiten Abschnitt angeführten Kaninchenversuche wurde parallel zur spektrophotometrischen Verfolgung des Trübungsablaufes im Reaktionsgemisch eine fortlaufende titrimetrische Bestimmung der freien Fettsäuren vorgenommen. Angewandt wurde die Methode von DOLE (1956): 0,5 ml des Reaktionsgemisches wurden in zur Ausschaltung der Alkalität des Glases silikonisierte Reagenzgläser mit Schliffstopfen pipettiert. Dazu wurden 5 ml Extraktionslösung, bestehend aus 5 Teilen Isopropylalkohol, 1 Teil n-Heptan, 0,1 Teil in H_2SO_4 und anschließend 2 ml n-Heptan und 3 ml bidestilliertes Wasser gegeben. Aus der sich nach kräftigem Schütteln absetzenden Oberphase wurden 0,5 ml zur Titration in silikonisierte Spitzgläschen übertragen. Als Indikator wurde 0,1 ml einer 0,01%igen alkoholischen Thymolblaulösung hinzugefügt. Titriert wurde mit 0,018 n NaOH im Mikrotitrator der Firma Beckman unter Einleiten von Stickstoff. Die Titration war beim Umschlag des Indikators von gelb nach grün beendet. Alle Titrationsen erfolgten als Doppelbestimmung.

4.3. Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse der alimentären Fettbelastungen beim Menschen und der intravenösen Fettbelastungen bei Kaninchen, jeweils mit und ohne Ateroidgaben, erfolgte in gleicher Weise. Der nach der Fettincorporation auftretende vorübergehende Anstieg des Serumtriglyceridgehaltes verursacht einen passageren Anstieg der Serumtrübung, der sich wiederum in Anstieg und Wiederabfall der spektrophotometrisch ermittelten Serumextinktionswerte manifestiert, d.h. parallel zum Anstieg und Wiederabfall der Serumtriglyceride findet

sich ein Anstieg und Wiederabfall der Serumextinktionswerte. Die während einer Fettbelastung im Testserum enthaltene Triglyceridmenge ist also dem Integral der Extinktionswertkurve dieses Serums proportional. Die Extinktionswerte an verschiedenen Tagen entnommener Nüchternseren ein und derselben Versuchspersonen (Entsprechendes gilt für Versuchstiere) können erheblich voneinander abweichen. Zur Ausschaltung dieser physiologischen Differenzen wurde vor der statistischen Berechnung die basale Lipämie von der Gesamtlipämie unter der Fettbelastung subtrahiert: Der Extinktionswert der Nullproben wurde jeweils von den Extinktionswerten der unter Testbedingungen entnommenen Serumproben abgezogen. Die so erhaltenen Extinktionswertreste repräsentieren den Triglycerid a n s t i e g am jeweiligen Meßpunkt der Fettbelastung. Dadurch lassen sich die Trübungsveränderungen mit und ohne Ateroidgaben vergleichen. Hierzu wurden die einzelnen Extinktionswertreste mit der Anzahl der seit der vorhergehenden Blutentnahme verstrichenen Minuten (z.B. 30, 60 und 120 bei den Tierversuchen) multipliziert. Die so erhaltenen "Extinktionsminuten" der Kontrollbelastung einerseits und der Testbelastung andererseits wurden addiert. Die Differenzen der Summe der Extinktionsminuten der Testbelastungen und der Kontrollbelastungen wurden als Prozent der Summe der Extinktionsminuten der Kontrollbelastungen angegeben. Die Umwandlung der absoluten Differenzen in Prozentwerte der Summe der Extinktionsminuten der Kontrollbelastung erscheint aus folgendem Grund zweckmäßig: Die Absolutwerte basaler und postcenalear Serumtrübung resp. -extinktion verschiedener Individuen können unter gleichen Bedingungen erheblich voneinander abweichen. Diese absoluten individuellen Unterschiede werden abgeschwächt durch Relativierung der Extinktionswertdifferenzen.

Der Mittelwert der in Prozent der Extinktionsminuten der Kontrollbelastung ausgedrückten Differenzen aus

Kontroll- und Testbelastung wurde nach

$$M = \frac{\sum D}{n}$$

die Standardabweichung nach

$$s = \sqrt{\frac{\sum (D-M)^2}{n-1}}$$

und die Standardabweichung des Mittelwertes nach

$$s_M = \sqrt{\frac{s}{n}}$$

berechnet.

Die Mittelwerte wurden mittels des Quotienten $\frac{M}{s_M}$ geprüft. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit P an, mit welcher die Mittelwerte zufällig von Null verschieden sind. In jedem Falle wurde P einseitig bestimmt.

Die statistische Auswertung der Trübungskurven der Reaktionsgemische mit Kaninchenserum, die 10 min nach intravenöser Injektion von Ateroid gewonnen wurden, erfolgte in analoger Weise. Wegen des asymmetrischen Kurvenverlaufes wurde jedoch jeweils der Mittelwert zweier benachbarter Extinktionswerte der Berechnung zugrunde gelegt:

$$\left(\frac{E_i + E_{i+1}}{2} \right)$$

Für die in-vitro-Klärversuche mit Humanserum, das zu verschiedenen Zeiten nach peroraler oder intraduodenaler Verabreichung von Ateroid gewonnen wurde, erübrigten sich statistische Berechnungen aufgrund der augenfällig negativen Ergebnisse.

4.4. Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse der Versuche, bei 12 Probanden eine alimentäre Lipämie durch präcénale orale Ateroid-Gabe zu beeinflussen, geben Abb.1 und Tab.1 wieder. Die Kurven

der mittleren Extinktionswerte der Kontroll- und Testbelastung zeigen übereinstimmend drei Stunden nach der Fettmahlzeit ein Trübungsmaximum. Einem steilen Anstieg der Serumtrübung folgt ein ebenso steiler Abfall derselben. Die Kurve der mittleren Extinktionswerte der Testbelastung liegt aber eindeutig unter der der Kontrollbelastung. Die Signifikanzprüfung beider Kurven bzw. Kurvenintegrale (= Summe der Extinktionsminuten) ist aus Tabelle 1 zu ersehen. Die Spalte 4 mit den prozentualen Differenzen der Summen der Extinktionsminuten zeigt, daß in 9 der 12 Fälle die durchschnittlichen Extinktionswerte der alimentär-lipämischen Seren nach Ateroid niedriger lagen als ohne Ateroid. In 3 Fällen waren die durchschnittlichen Extinktionswerte in der Testbelastung höher als in der Kontrollbelastung. Dabei zeigen sowohl die positiven als auch die negativen Differenzen eine erhebliche Streubreite. Die beträchtliche physiologische Schwankungsbreite alimentär-lipämischer Serumtrübungswerte ist bekannt (SCHETTLER 1963) und eine eindeutige Schwäche der angewandten Methodik. Die Spalte 7 der Tab.1 gibt das negative Ergebnis der Signifikanzprüfung wieder: $0,1 > P > 0,05$.

Durch präcénale orale Ateroid-Gabe ließ sich der Serumtrübungsablauf während einer alimentären Lipämie bei Versuchspersonen nicht signifikant beeinflussen.

Die Abbildungen 2 bis 5 zeigen die Ergebnisse der Versuche, bei 4 Probanden durch hochdosierte perorale Ateroid-Gaben die Serumkläraktivität zu beeinflussen. Aus allen Abbildungen geht hervor, daß die Extinktionswerte der Reaktionsgemische mit den zu verschiedenen Zeiten entnommenen Testseren sich nicht auffällig voneinander und von den Werten des Kontrollgemisches unterscheiden. Die Ausgangstrübungen sind in allen Proben etwas voneinander verschieden. Die Extinktionswertkurven verlaufen während der 15-minütigen Meß-

zeit alle ohne größere quantitative oder qualitative Differenzen leicht abwärts. Die geringe Trübungsabnahme dürfte auf physikalisch-chemische Veränderungen in den Proben zurückzuführen sein. Ein Anhalt für das Einsetzen einer Klärreaktion findet sich nicht. Ateroid führte bei peroraler Applikation an Versuchspersonen nicht zu einer Steigerung der in-vitro-Klärfähigkeit des Serums.

Bei 5 Versuchspersonen wurden durch intraduodenale Instillation wäbrig gelösten Ateroids optimale Resorptionsbedingungen geschaffen und die Möglichkeit einer Substanzinaktivierung durch Magensäure sicher ausgeschaltet. Die Ergebnisse der Versuche, bei dieser Verabreichungsform kläraktive Seren zu erhalten, demonstrieren die Abbildungen 6 bis 10. Die Extinktionswertkurven der einzelnen Proben liegen auch hier auf verschiedenem Niveau. Die Kurven verlaufen vom Beginn der Inkubation bis zum Endpunkt der Messungen nach 15 min leicht abwärts. Darin dürften sich wieder optisch wirksame physikalisch-chemische Veränderungen der Reaktionsgemische manifestieren. Die Kurven geben bei allen 5 Versuchen gleiche Bilder. Die Trübungsabläufe der einzelnen Proben unterscheiden sich praktisch nicht voneinander und nicht von denen der Kontrolle. Zeichen einer Klärreaktion finden sich auch in dieser Versuchsgruppe nicht.

Mittels intraduodenaler Ateroid-Instillation ließ sich keine in vitro nachweisbare Klärfaktoraktivierung des Serums auslösen.

Die Ergebnisse der intravenösen Fettbelastungen mit und ohne Ateroid bei 7 Kaninchen sind in Abb.11 dargestellt. Die intravenöse Lipidinjektion führt zu einem schnellen Anstieg der Serumtrübung mit einem Maximum derselben nach 30 min, dem ein schneller Trübungsabfall in den nächsten 30 min und ein etwas lang-

samerer in weiteren 30 min folgt. Die Kurve der Testbelastungen verläuft wie die der Kontrollen, erreicht aber nur ein geringeres Maximum. Die zwischen beiden Kurven liegende Fläche ist die Differenz ihrer Integrale, entspricht mithin der Differenz der Summe der Extinktionsminuten von Kontroll- und Testbelastungen. Diese Differenz wurde in Tab.2 Spalte 4 in Prozenten der Summe der Extinktionsminuten der Kontrollbelastung angegeben. Die Signifikanzprüfung ergibt, daß die Differenz beider Kurvenintegrale im Zufallsbereich liegt: $0,1 > P > 0,05$. Auffällig sind die Werte von Versuchstier 6. Lediglich hier liegt - im Gegensatz zu allen übrigen Tieren - die Summe der Extinktionsminuten nach Ateroid-Gabe über der Summe der Extinktionsminuten des Kontrollgemisches. Daraus resultiert eine beträchtliche positive prozentuale Differenz der Trübungsintegrale von Kontroll- und Testbelastung. Außerdem fällt auf, daß bei diesem Fall die Extinktionswerte im Kontrollversuch niedriger als bei allen anderen Versuchstieren waren. Wird Versuchstier 6 aus dem Kollektiv ausgeschlossen (s. Diskussion), ergeben sich $M = 49,0$, $S_M = 13,0$; $0,01 > P > 0,005$. D.h. bei dem Rest der Versuchstiere ist der einer intravenösen Lipidinjektion folgende Serumtrübungsablauf durch oral gegebenes Ateroid signifikant beeinflusst worden.

Die Versuche, mittels intravenöser Ateroid-Injektion bei Kaninchen eine Serumkläraktivität zu erzeugen, waren erfolgreich. Die Ergebnisse der in-vitro-Klärung sind in Abb.12 dargestellt. In allen Reaktionsgemischen mit den Testseren, die 10 min nach der Heparinoidinjektion gewonnen wurden, zeigt sich ein markanter Trübungsabfall, der auch bereits mit bloßem Auge sichtbar war. Dieser Effekt war am größten bei Versuchstier 5 und am geringsten bei Versuchstier 4. Die anfänglichen Extinktionswertänderungen der Kontrollgemische (dreimal leichter Anstieg, einmal Abfall) dürften auf physikalische Änderungen im Gemisch zurückzuführen

sein. Entsprechend findet sich in den Trübungsabläufen der Testgemische manchmal auch zunächst ein leichter Anstieg bzw. ein schwächerer Abfall der Extinktionswerte, allerdings stets gefolgt von schnellem Extinktionsabfall. Dieser letztgenannte Effekt ist am stärksten in den ersten 20 bis 25 min der Inkubation, dann verlaufen die Kurven flacher. Die Signifikanzprüfung zeigt Tab.4. Dabei bestätigt sich der augenfällige Unterschied der Trübungsabläufe in Kontroll- und Testgemischen als hochsignifikant: $0,0025 > P > 0,0005$.

Um zu prüfen, ob die Klärung der mit "Postateroidserum" angesetzten Reaktionsgemische tatsächlich auf einer Hydrolyse der Substrattriglyceride beruht und nicht etwa durch physikalisch-chemische Veränderungen des Substrats bedingt ist, wurde parallel zur photometrischen Verfolgung des Trübungsablaufes eine fortlaufende titrimetrische Bestimmung der freien Fettsäuren vorgenommen. Diese Bestimmung erfolgte im Reaktionsgemisch von Versuchstier 4, bei dem die Trübungsabnahme das geringste Ausmaß im Vergleich zu den übrigen Versuchstieren hatte. Abb.13 zeigt die Ergebnisse. Die bei der Titration von jeweils 5 ml des Reaktionsgemisches bestimmten Mengen freier Fettsäuren wurden bezogen auf 1 ml des "Postateroidserums". Dabei fand sich ein Anstieg der freien Fettsäuren von $0,417 \mu\text{val/ml}$ Postateroidserum auf $0,569 \mu\text{val/ml}$ nach 20 min, $0,732 \mu\text{val/ml}$ nach 45 min und $0,787 \mu\text{val/ml}$ nach 60 min Inkubation. Innerhalb von 60 min war also der Gehalt des Reaktionsgemisches an freien Fettsäuren um $0,37 \mu\text{val/ml}$ Postateroidserum angestiegen. Die Kurve zeigt einen etwa linearen Anstieg der freien Fettsäuren entsprechend einem etwa linearen Abfall der Extinktionswertkurve von Versuchstier 4 in Abb.13. Im Kontrollgemisch blieb die Konzentration der freien Fettsäuren konstant. Es erwies sich also, daß nach intravenöser Injektion

von Ateroid gewonnenes Kaninchenserum zur Hydrolyse eines künstlichen Triglyceridssubstrates befähigt ist.

4.5. Diskussion

Die negativen Ergebnisse der Klärversuche mit Ateroid (Ateroid-Fettbelastungen, in-vitro-Klärversuche nach peroraler und intraduodener Applikation des Duodenalheparinoids bei Versuchspersonen) stehen im Gegensatz zu den Erfolgen zahlreicher italienischer Autoren, die nach oraler Gabe des Duodenalheparinoids eindeutige Veränderungen von Serumkläraktivität, Lipidämie, Cholesteringehalt, Serumtrübung, β/α -Lipoproteidquotient etc. fanden. Diese Effekte wurden vorwiegend mit Langzeitbehandlungen erzielt. Arbeiten, in welchen im akuten Test die Kläraktivitätsbeeinflussung durch Ateroid geprüft wurde, sind weniger zahlreich.

Deutliche Steigerung der Kläraktivität sah BIANCHINI (1961) bei Ratten nach intravenöser und intraperitonealer Injektion der Substanz. Diesen Untersuchungen entsprechen in der vorliegenden Arbeit die Versuche, bei Kaninchen nach intravenöser Ateroid-Injektion Kläraktivität nachzuweisen. Übereinstimmend mit BIANCHINI (1961) wurde nach der intravenösen Injektion des Duodenalheparinoids eine statistisch signifikante Kläraktivitätssteigerung gefunden. Das nach der Substanzverabreichung gewonnene Serum war zur Klärung eines künstlichen Triglyceridssubstrates befähigt. Die Klärung beruhte auf einer Hydrolyse der Substrattriglyceride: Entsprechend dem Abfall der optischen Dichte des Reaktionsgemisches zeigte die fortlaufende titrimetrische Bestimmung einen Anstieg der freien Fettsäuren. Das spricht dafür, daß der Klärungsmechanismus nach intravenöser Gabe des Duodenalheparinoids bei Kaninchen dem nach intravenöser Injektion von Heparin entspricht.

POLTRONIERI u. Mitarb. (1959) erreichten bereits nach einmaliger oraler Ateroidgabe (40 mg) einen Abfall der turbidimetrisch bestimmten Lipämie um 15 bis 30 %. Ande-

rerseits sahen sie in einer Gruppe von 10 Versuchspersonen keine Unterschiede in den Serumtrübungskurven nach einer Fettmahlzeit bzw. nach einer Fettmahlzeit und Ateroid-Gabe. ANTONINI u. SORDI (1961) fanden in Seren, die sie nach oraler Ateroid-Gabe (100 mg) entnahmen und bei 37° C inkubierten, teilweise einen erheblichen Anstieg der Konzentration der freien Fettsäuren. Ihre Arbeiten mit ¹³¹J-markierten Fetten ergaben nach gleichzeitiger Fett- und Ateroid-Einnahme einen beschleunigten Fettumsatz, verglichen mit den Fettbelastungen ohne Ateroid. Bei den Versuchspersonen von PERUZY u. SERENO (1958) war nach einer einwöchigen oralen Ateroid-Behandlung der einer alimentären Fettbelastung folgende Anstieg des β/α -Lipoproteidquotienten geringer als vor der Behandlung.

ANTONINI u. SORDI (1961) sahen dagegen nach 15-tägiger oraler Ateroid-Behandlung und nachfolgender Fettbelastung nur in einigen Fällen einen Abfall der optischen Trübung, des β/α -Lipoproteidquotienten und der Cholesterinkonzentration verglichen mit den Werten vor der Behandlung. Dabei zeigte sich weder eine spontane Kläraktivitätssteigerung noch eine Steigerung der Kläraktivität nach Standardheparininjektion. Die Erfahrungen mit der Klärwirksamkeit von Ateroid im akuten Versuch sind offenbar unterschiedlich. In der vorliegenden Arbeit wurde eine eventuelle sofortige orale Wirksamkeit des Duodenalheparinoids auf verschiedene Weise geprüft:

Die Serumtrübungskurven während einer alimentären Lipämie nach einer Fettbelastung ohne und mit präcenaler oraler Ateroid-Gabe bei Versuchspersonen unterschieden sich. Die Serumtrübungskurve erreichte bei den Testbelastungen (mit Ateroid) geringere Werte als bei den Kontrollbelastungen (ohne Ateroid). Die Trübungsdifferenz war nicht statistisch signifikant. Das zur Bestimmung der Lipämie angewandte turbidimetrische Verfahren ist brauchbar. HEYMANN (1961) wies mit derselben Methode nach, daß sublingual gegebenes Kalium-Heparin die

alimentäre Serumtrübung nicht beeinflusst. SCHÖLL u. KOPITZKI (1964) zeigten in gleicher Versuchsanordnung, daß sublingual gegebenes Natrium-Heparin mit freien Carboxylgruppen die alimentäre Serumtrübungskurve deutlich senkt. POLTRONIERI u. Mitarb. (1959) bestimmten in ihren Versuchen die Lipämie ebenfalls turbidimetrisch. ANTONINI u. SORDI (1961) zogen neben der chemischen Analyse der Serumveränderungen ebenfalls die optische Trübung des Serums als Maßstab der Lipämie hinzu. In der zusammenfassenden Arbeit von BIANCHINI (1961) wird die Beeinflussung der Serumtrübung als ein wesentliches Kriterium der Ateroid-Wirksamkeit angesehen. PERUZY und SERENO (1958) fanden, daß Ateroid eindeutiger auf die Lipoproteide als auf Cholesterin wirkt. Die Lipoproteide aber sind für die Serumtrübung verantwortlich. AZZENA u. Mitarb. (1959) sahen bei ihren Langzeitbehandlungen mit Ateroid, daß die Lipoproteide der LDL-Gruppe (low density Lipoproteine) am empfindlichsten reagierten. Zu diesen Lipoproteiden gehören auch die Chylomikronen und damit die die optische Trübung verursachenden Teilchen. Schließlich wurde die Brauchbarkeit der Trübungsmessung zur Erfassung einer Klärfaktoraktivierung durch Ateroid in der vorliegenden Arbeit bestätigt: Nach intravenöser Ateroid-Injektion bei Kaninchen konnte klärfähiges Serum gewonnen werden. Die Dosierung von Ateroid - verglichen mit den Angaben in der Literatur - war mit 100 mg hoch. Wenn bei Verwendung der als zweckmäßig bestätigten Methode der Kläraktivitätsbestimmung die Serumtrübungskurve nach Fettbelastung mit Ateroid nicht signifikant niedriger lag als die nach Fettbelastung ohne Ateroid, so muß daraus geschlossen werden, daß in dieser Versuchsanordnung keine Aktivierung des Klärfaktors stattgefunden hat.

Bei den Versuchen, ein in vitro klärfähiges Serum zu erhalten, wurden den Versuchspersonen sehr hohe Dosen der Testsubstanz verabreicht (10 bis 20 mg Ateroid/kg

Körpergewicht, maximal 1750 mg). Diese Dosierung beträgt ein Vielfaches der in der Literatur angegebenen. Das zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation entnommene Serum war in vitro nie klärwirksam. Da die Blutentnahmen über einen breiten Zeitraum nach der Substanzverabreichung (maximal bis 8 Std. nach der Tabletteneinnahme) erfolgten und da die Trübungsmessung am Postateroidserum-Substratgemisch über eine angemessene Zeit vorgenommen wurde, ist nicht anzunehmen, daß freigesetzter oder aktivierter Klärfaktor nicht erfaßt wurde. Er trat also nicht auf. Wieweit Ateroid überhaupt enteral resorbiert wurde, kann nicht angegeben werden, da eine Bestimmung der Substanz im Stuhl oder Urin (als Hauptausscheidungsquelle) unterblieb.

Ateroid ist nach BIANCHINI (1961) säurelabil und wird durch Magensalzsäure teilweise zerstört. Um die Magensäure und damit die mögliche Inaktivierung der Substanz zu umgehen, wurde Versuchspersonen wäßrig gelöstes Ateroid mittels Sonde in das Duodenum instilliert. Damit dürften optimale Resorptionsbedingungen gegeben sein. Eine vorhandene Fähigkeit der Substanz, nach peroraler Applikation Klärfaktor freizusetzen, mußte sich hierbei zeigen. Mit den zu verschiedenen Zeiten nach dieser Applikation entnommenen Seren konnte das Lipofundinsubstrat in vitro nie geklärt werden. Die Dosierung des Duodenalheparinoids war mit 10 mg/kg Körpergewicht hoch. Die Blutentnahmen erfolgten über einen breiten Zeitraum nach der Instillation (bis 4 Std.), in einem Falle halbstündlich. Das Trübungsverhalten des Postateroidserum-Substratgemisches wurde über 15 bis 20 min kontrolliert. Man kann also mit Sicherheit annehmen, daß eventuell aufgetretener aktiver Klärfaktor hätte erfaßt werden müssen. Das negative Ergebnis der in-vitro-Klärversuche weist somit eindeutig darauf hin, daß auch nach hochdosierter intraduodenaler Ateroid-Applikation im strömenden Blut keine klärfähige Substanz aufgetreten ist. Auch hier bleibt die Frage offen, ob Ateroid

mangelhaft oder nicht enteral resorbiert wurde oder ob ihm trotz genügender Resorption die Fähigkeit, Klärfaktor zu aktivieren, fehlt.

Die Trübungswerte der alimentären Lipämie wiesen bei den Versuchspersonen eine erhebliche Streubreite auf. Mit der Absicht, reproduzierbare Serumtrübungsabläufe zu erzeugen, wurde bei Kaninchen durch intravenöse Injektion einer Fettemulsion eine Lipämie erzeugt. Auch hierbei zeigte sich eine große Streuung der Extinktionswerte der lipämischen Seren innerhalb des Versuchskollektivs (Tab.3). Die Trübungskurve der Testbelastungen (intravenöse Injektion von Lipofundin nach vorangegangener Ateroidgabe per os) lag deutlich unter der der Kontrollbelastungen (ohne Ateroid). Die Signifikanzprüfung ergab aber, daß die Differenz beider Kurven noch im Zufallsbereich lag. Bei dieser aus 7 Fällen bestehenden Gruppe fanden sich sechsmal qualitativ gleichsinnige Trübungsabläufe: Mit Ausnahme des Tieres Nr.6 lag die Summe der Extinktionsminuten der Testbelastung stets - mehr oder weniger different - niedriger als die der Kontrollbelastung. Bei Versuchstier 6 war die Summe der Extinktionsminuten der Testbelastung aber erheblich größer als die der Kontrollbelastung. Dabei lag letztere beträchtlich unter der aller übrigen Kontrollbelastungen. Schließt man daraus, daß die Trübungswerte in diesem Falle aufgrund eines experimentellen Fehlers (evtl. unbemerkte paravenöse Injektion der Fettemulsion) im Kontrollversuch fälschlich zu niedrig liegen, so wäre Tier 6 vor der Signifikanzprüfung als Extremwert zu eliminieren. Unter dieser Kondition ergibt sich ein aus den Fällen 1 bis 5 und 7 errechneter Mittelwert $M = -49,0$, eine Standardabweichung des Mittelwertes $S_M = 13,0$ und damit ein signifikant unterschiedliches Verhalten ($0,01 > P > 0,005$) der Trübungsabläufe in Kontroll- und Testbelastung. Die damit gefundene Beeinflussung des Serumtrübungsablaufes während einer intravenös erzeugten Lipämie steht

im Gegensatz zur Unwirksamkeit von Ateroid bei alimentären Lipämien des Menschen. Das Duodenalheparinoid wurde in beiden Versuchsgruppen in säureresistenten Kapseln per os gegeben. Die Substanz wurde bei den Versuchspersonen also erst nach Auflösung der Kapsel im Dünndarm frei. Die Versuchstiere zerkauten aber in jedem Fall die Kapseln. Die Substanz wurde dadurch bereits in der Mundhöhle der Tiere frei. Möglicherweise kam es dadurch zu einer unbeabsichtigten oralen Resorption des Heparinoids. Dieses Ergebnis entspräche der Versuchsanordnung von SCHÖLL und KOPITZKI (1964), die bei Versuchspersonen nach sublingualer Gabe von Natriumheparin mit freien Carboxylgruppen eine Senkung der Serumtrübungskurve bei alimentärer Lipämie sahen.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß das aus Duodenalschleimhaut isolierte Sulfomukopolysaccharid sicher Klärfaktor freisetzt bei intravenöser Verabreichung an Kaninchen, offenbar auch nach Resorption durch die Mundhöhlenschleimhaut dieser Tiere. Unwirksam erwies sich die Substanz dagegen bei peroraler und intraduodenaler Verabreichung an Versuchspersonen. Nach dieser Feststellung kann die im Tierversuch und an Versuchspersonen erwiesene lipoidsenkende Wirkung bei oraler Anwendung der Substanz nicht auf Klärfaktor-Induzierung beruhen, sie muß vielmehr Ergebnis eines vom Heparin und von den Heparinoiden abweichenden Mechanismus sein. Es sei an die von SCHULER u. Mitarb. (1957) beschriebenen Stoffe erinnert, die in vivo lipämische Serumtrübungen ohne Klärfaktorwirkung beseitigen. Ebenso beobachteten ANTONINI u. SORDI (1961) - wenn auch nur in einigen Fällen - nach 15-tägiger oraler Ateroid-Zufuhr und nachfolgender Fettbelastung einen Abfall der optischen Trübung, des β/α -Lipoproteidquotienten und des Gesamtcholesteringehaltes, verglichen mit den Werten vor der Ateroid-Behandlung. Dieser Effekt trat ohne nachweisbare Klärfaktoraktivierung auf.

Nicht beantwortet wurde die Frage, ob und in welchem

Ausmaß Ateroid enteral resorbiert wird. Das Heparinoid wurde den Versuchspersonen in säureresistenten Kapseln entweder per os verabreicht oder in wäßriger Lösung intraduodenal instilliert. Stuhluntersuchungen zur Bestimmung des Quantums nicht resorbierter Substanz erfolgten nicht. Ebenso unterblieb die Erfassung eventuell resorbierten und im Urin ausgeschiedenen Duodenalheparinoids. Da aber Ateroid bei intravenöser Gabe Kaninchenserum sicher klärfähig macht, scheint der Schluß erlaubt, daß die fehlende Klärungsinduktion beim Menschen nach peroraler und intraduodenaler Applikation auf fehlende oder unterschwellige Resorption - wenn nicht auf Inaktivierung im Magen-Darmtrakt - zurückzuführen ist. Diese Aussage erfolgt natürlich mit Einschränkung, da aus der Effektivität beim Kaninchen nicht zwingend auf eine solche beim Menschen geschlossen werden kann. Ein Ateroid-Präparat zur intravenösen Verwendung beim Menschen, mit dem diese Frage hätte gelöst werden können, stand leider nicht zur Verfügung.

4.6. Zusammenfassung

Nach kurzen Bemerkungen zur Fettresorption und alimentären Lipämie wurden die Serumlipoproteidlipase und die Klärreaktion beschrieben. Die Zusammenstellung von Arbeiten über klärungsinduzierende Eigenschaften heparinähnlicher und andersartiger Substanzen führte zum Thema der vorliegenden Arbeit: Die Klärwirksamkeit eines von BIANCHINI (1958) entdeckten, aus Duodenalschleimhaut isolierten Sulfomukopolysaccharids, das unter der Bezeichnung Ateroid im Handel ist, wurde auf verschiedene Weise geprüft. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Literaturangaben über die biologische Wirksamkeit dieser Substanz verglichen. Dabei zeigte sich:

1.) Die intravenöse Verabreichung von Ateroid an Kaninchen befähigt Kaninchenserum eindeutig zur in-vitro-Klärung eines Lipoidsubstrates. Die Klärung beruht auf Hydrolyse der Triglyceride des Substrates.

2.) Werden Kaninchen durch intravenöse Injektion einer Lipidemulsion lipämisch gemacht, so beschleunigt peroral gegebenes Ateroid - wahrscheinlich nach Resorption über die Mundhöhlenschleimhaut - den intravitalen Klärungsablauf statistisch signifikant.

3.) Beim Menschen hat Ateroid nach einmaliger oraler Applikation keinen statistisch sicheren Einfluß auf den Ablauf einer akuten alimentären Lipämie.

4.) Humanserum wird durch perorale Applikation von Ateroid in säureresistenten Kapseln nicht zur in-vitro-Klärung eines Lipoidsubstrates befähigt.

5.) Auch die intraduodenale Instillation gelösten Ateroids bei Versuchspersonen führt nicht zur in vitro nachweisbaren Steigerung der Serumkläraktivität.

Tabellen und Abbildungen

Abb.1) Serumstrübungsablauf bei Versuchspersonen während einer alimentären Fettbelastung mit und ohne Ateroid (100 mg).

Die Kurve der Kontrollbelastung (ohne Ateroid) ist ausgezogen, die der Testbelastung (mit Ateroid) ist unterbrochen dargestellt. Die Ordinate gibt die Extinktionswerte an, die Abszisse die zwischen Fettmahlzeit bzw. Fettmahlzeit und Substanzverabreichung und Blutentnahme verstrichene Zeit. Die angegebenen Extinktionen sind Durchschnittswerte von 12 Versuchspersonen.

Tab.1) Wirkung von 100 mg Ateroid (10 Dragees zu 10 mg) auf die alimentäre Serumtrübung von 12 Versuchspersonen.

- Spalte 1: Nummer der Versuchsperson,
Spalte 2: Summe der Extinktionsminuten der Kontrollbelastung,
Spalte 3: Summe der Extinktionsminuten der Testbelastung,
Spalte 4: Differenz der Summen der Extinktionsminuten der Kontroll- und Testbelastung, ausgedrückt in % der Summe der Extinktionsminuten der Kontrollbelastung,
Spalte 5: M = Mittelwert der prozentualen Differenzen aus Spalte 4,
Spalte 6: s_M = Standardabweichung des Mittelwertes,
Spalte 7: Ergebnis der Signifikanzprüfung.

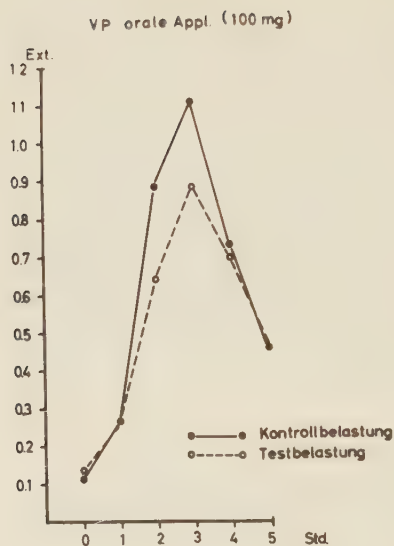


Abb. 1

VP	$(\Sigma E \cdot \Delta t)_K$	$(\Sigma E \cdot \Delta t)_T$	D	M	s_M	P
1	149,58	110,70	- 26,0	- 17,6	10,9	$< 0,10$ $> 0,05$
2	108,72	102,48	- 5,7			
3	99,30	67,74	- 31,8			
4	174,78	85,20	- 51,3			
5	201,90	81,18	- 72,2			
6	116,88	53,70	- 54,1			
7	111,06	68,10	- 38,7			
8	140,34	225,42	+ 50,9			
9	49,38	69,06	+ 39,9			
10	354,06	335,24	- 5,0			
11	269,50	139,80	- 31,0			
12	105,00	223,08	+ 14,4			

Tab. 1

Abb.2 bis 5) Klärfaktoraktivität im Serum von Versuchspersonen vor und zu verschiedenen Zeiten nach oraler Gabe von 100 mg Ateroid/kg Körpergewicht.

Die Ordinate gibt die Extinktionswerte der Reaktionsgemische (mit Humanalbuminlösung inkubiertes Untersuchungsserum plus Lipofundin-substrat) an, die Abszisse die Inkubationsdauer der Mischungen. Die Ziffern an der rechten Seite der Kurven geben die zwischen Substanzverabreichung und Entnahme dieses Serums verstrichene Zeit (in Stunden) an. 0 bezeichnet das vor der Ateroid-Gabe gewonnene Kontrollserum.

Eine Abbildung gibt jeweils die von einer Versuchsperson erhaltenen Werte wieder.

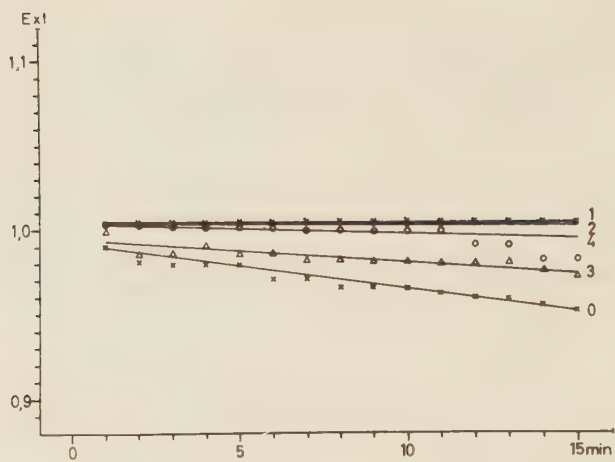


Abb. 2

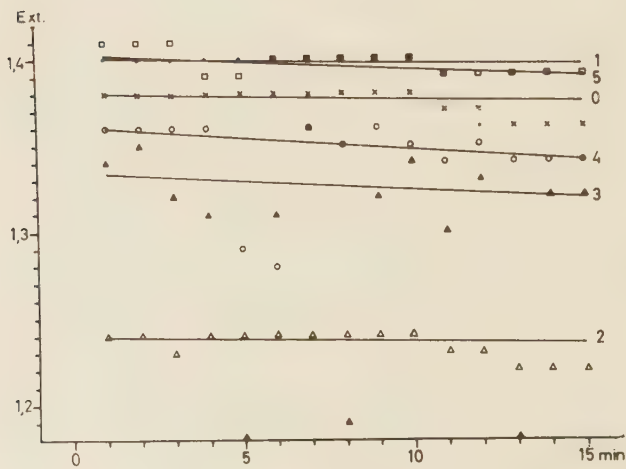


Abb. 3

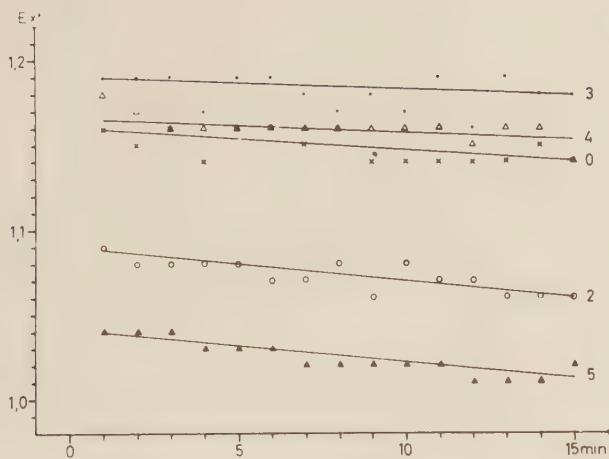


Abb. 4

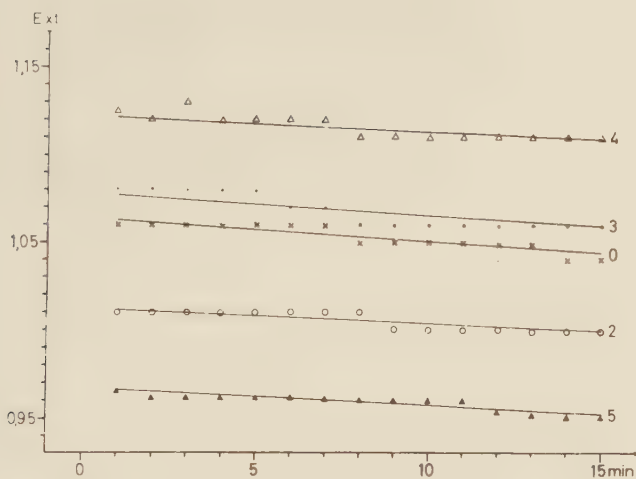


Abb. 5

Abb. 6 bis 10) Klärfaktoraktivität im Serum von Versuchspersonen vor und zu verschiedenen Zeiten nach intraduodenaler Instillation wäßrig gelösten Ateroids in der Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht.

Die Ordinate gibt die Extinktionswerte der Reaktionsgemische (mit Humanalbuminlösung inkubiertes Untersuchungsserum plus Lipofundinsubstrat) an, die Abszisse die Inkubationsdauer der Gemische. Die Ziffern an der rechten Seite der Kurven geben die zwischen Substanzverabreichung und Entnahme dieses Serums verstrichene Zeit (in Stunden) an. 0 bezeichnet das vor der Ateroid-Gabe gewonnene Kontrollserum.

Eine Abbildung gibt jeweils die von einer Versuchsperson erhaltenen Werte wieder.

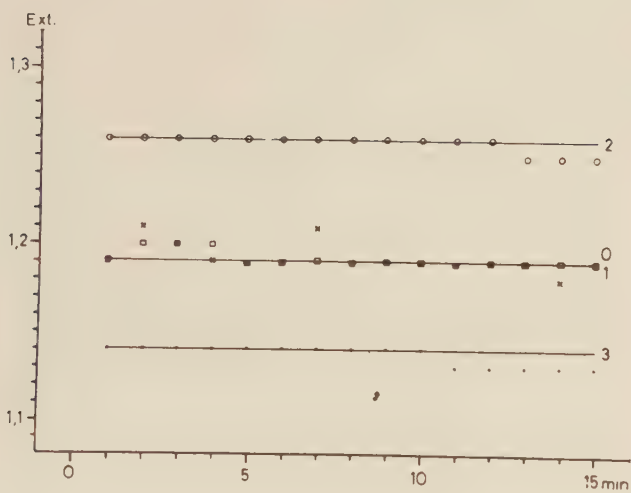


Abb. 6

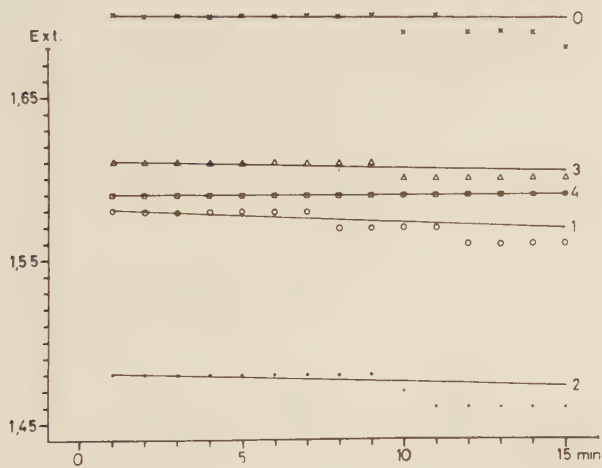


Abb. 7

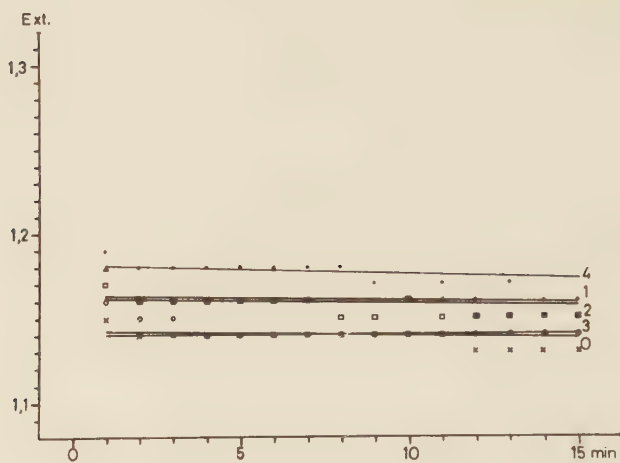


Abb. 8

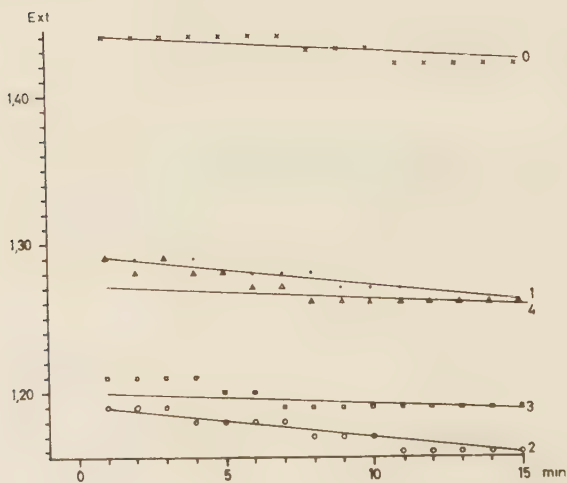


Abb. 9

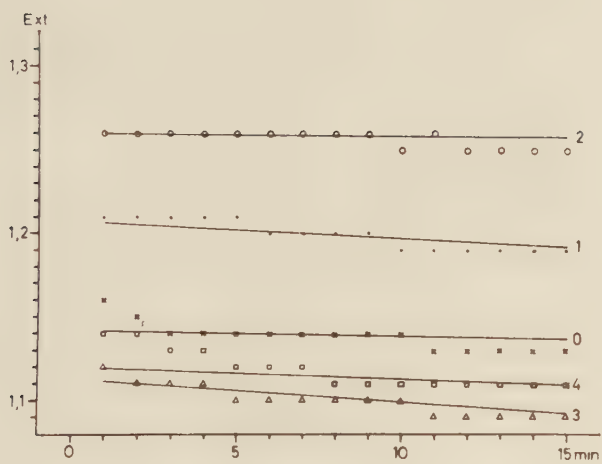


Abb. 10

Abb. 11) Serumtrübungsablauf bei Kaninchen nach intravenöser Lipofundin-Injektion (4 mg/kg Körpergewicht) ohne bzw. nach Ateroid-Gabe per os (100 mg/kg Körpergewicht).

Die Kurve der Kontrollbelastung (ohne Ateroid) ist ausgezogen, die der Testbelastung (mit Ateroid) ist unterbrochen dargestellt. Die Ordinate gibt die Extinktionswerte an, die Abszisse die zwischen Lipidinjektion und Blutentnahme verstrichene Zeit. Die angegebenen Extinktionen sind Durchschnittswerte von 7 Versuchstieren.

Tab. 2) Wirkung von 100 mg Ateroid/kg Körpergewicht (per os) auf die durch Lipofundin-Injektion erzeugte Serumtrübung bei 7 Kaninchen.

Spalte 1: Nummer des Versuchstieres,

Spalte 2: Summe der Extinktionsminuten
der Kontrollbelastung,

Spalte 3: Summe der Extinktionsminuten
der Testbelastung,

Spalte 4: Differenz der Summen der Extinktions-
minuten der Kontroll- und Testbelastung,
ausgedrückt in % der Summe der Extink-
tionsminuten der Kontrollbelastung,

Spalte 5: M = Mittelwert der prozentualen Diffe-
renzen aus Spalte 4,

Spalte 6: s_M = Standardabweichung des Mittel-
wertes,

Spalte 7: Ergebnis der Signifikanzprüfung

Tab. 3) Wirkung von 100 mg Ateroid/kg Körpergewicht auf die durch Lipofundin-Injektion erzeugte Serumtrübung bei 7 Kaninchen

(M = Mittelwert, s_M = Standardabweichung des Mittelwertes).

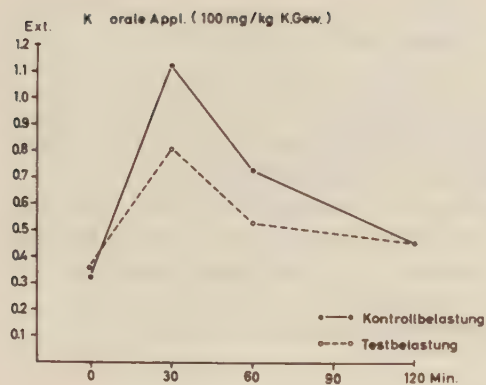


Abb. 11

K	$(\Sigma E \cdot \Delta t)_K$	$(\Sigma E \cdot \Delta t)_T$	D	M	s_M	P
1	54,48	51,33	- 5,8			
2	75,75	9,69	- 87,2			
3	33,90	7,80	- 77,0			
4	42,81	23,45	- 45,3	- 33,0	10,6	$< 0,10$
5	28,47	11,16	- 60,8			$> 0,05$
6	20,01	32,70	+ 63,4			
7	42,45	34,77	- 18,1			

Tab. 2

min	Trübung des Serums unbehandelte Tiere (E 540 mp) $\bar{x} \pm s$	Trübung des Serums behandelte Tiere (E 540 mp) $\bar{x} \pm s$
C	$0,33 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,11$
30	$1,12 \pm 0,42$	$0,81 \pm 0,50$
60	$0,72 \pm 0,25$	$0,54 \pm 0,20$
120	$0,45 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,18$

Tab. 3

Abb. 12) Kläraktivität im Serum von Kaninchen vor und nach intravenöser Zufuhr von Ateroid (60 mg).

Die Kurven der Kontrollgemische (mit Serum, das vor der Ateroid-Injektion entnommen wurde) sind ausgezogen, die der Testgemische (mit 10 min nach Ateroid-Injektion gewonnenen Seren) sind unterbrochen dargestellt. Die Ordinate gibt die Extinktionswerte der Reaktionsgemische an, die Abszisse die Inkubationsdauer der Mischungen. Die römischen Ziffern an der rechten Seite der Kurven sind die Nummern der Versuchstiere.

Tab. 4) Klärfaktor-Aktivität im Serum von 7 Kaninchen vor und nach intravenöser Zufuhr von Ateroid (60 mg).

Spalte 1: Nummer des Versuchstieres,
Spalte 2: Summe der Extinktionsminuten
des Kontrollgemisches,
Spalte 3: Summe der Extinktionsminuten
des Testgemisches,
Spalte 4: Differenz der Summen der Extinktions-
minuten des Kontroll- und Testgemisches,
ausgedrückt in % der Summe der Extink-
tionsminuten des Kontrollgemisches,
Spalte 5: M = Mittelwert der prozentualen
Differenzen aus Spalte 4,
Spalte 6: s_M = Standardabweichung des Mittel-
wertes,
Spalte 7: Ergebnis der Signifikanzprüfung.

K 4

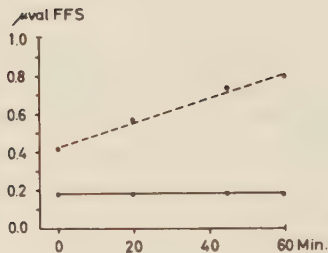


Abb. 13) Titrimetrische Bestimmung der Klärfaktor-Aktivität im Serum eines Kaninchens (Versuchstier 4) vor (ausgezogene Linie) und nach (unterbrochene Linie) intravenöser Ateroid-Zufuhr.

Die Abszisse gibt die Inkubationszeit des Reaktionsgemisches (mit Humanalbuminlösung inkubiertes Untersuchungsserum plus Lipofundinsubstrat) an, die Ordinate den Gehalt des Gemisches an freien Fettsäuren, bezogen auf 1 ml Untersuchungsserum.

Literaturverzeichnis

- ALBRINK, M.J., E.B.MAN and J.P.PETERS: The relation of neutral fat to lactescence of serum. J. clin. Invest. 34, 147-157 (1955).
- ANDERSON, N.G. and B.FAWCETT: An antichylomicronemic substance produced by heparin injection. Proc. Soc. exp. Biol. 74, 768-771 (1950).
- ANFENSEN, C.B., E.BOYLE and R.K.BROWN: The role of heparin in lipoprotein metabolism. Science 115, 583-586 (1952).
- ANFENSEN, C.B. and T.W.QUIGLEY: Purification of clearing factor by substrate - complex formation. Circulation 8, 435-436 (1953).
- ANTONINI, F.M. u. A.SORDI: The serum lipid lowering effect of nicotinic acid and 3-pyridylacetic acid and duodenal heparinoid and their possible mechanism of action. In: Drugs affecting lipid metabolism. Ed. by S.GARATTINI, R.PAOLETTI. Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1961, S. 392-411.
- AZZENA, D., F.ASTENGO, G.GHIGLIOTTI: Variations of the various lipoprotein fractions induced by the administrations of a heparinoid substance extracted from the duodenal mucosa. Minerva medica 50, 2190-2192 (1959).
- BENEDETTI, G., F.MAZZA u. G.FERRETTI: Esperienze terapeutiche con un nuovo eparinoide antiaterogeno ad azione chiarificante del plasma e non anticoagulante. Rass. fisiopatol. clin. e terap. 31, 267 (1959).
- BIANCHINI, P.: Su di un eparinoide del Pancreas. Bull. Soc. It. Biol. Sper. 34, 1795-1800 (1958).

- BIANCHINI, P.: Lipid regulating activity of a duodenal mucosa heparinoid. In: Drugs affecting lipid metabolism. Ed. by S. GARATTINI, R. PAOLETTI. Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1961, S. 168-180.
- BIANCHINI, P.: Su di un eparinoide della mucosa duodenale -
1) Metacromasia ed acidi uronici. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 34, 685-688 (1958).
- BIANCHINI, P. u. OSIMA, B.: Sulla attivita chiarificante di un eparinoide della mucosa duodenale. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 35, 193-196 (1959).
- BLOOM, B., CHAIKOFF, I. L. and REINHARDT, W. O.: Intestinal lymph as pathway for transport of absorbed fatty acids of different chain lengths. Am. J. Physiol. 166, 451-455 (1951).
- BROWN, R. K., E. BOYLE and C. B. ANFINSEN: The enzymatic transformation of lipoproteins. J. biol. Chem. 204, 423-434 (1953).
- CANTONE, A., RULLY, V., ROSSI, B.: Antilipemic activity of an extract of hog gastric mucosa. Circulation researche 7, 291-295 (1959).
- CAPRARO, V., CANTONE, A. und CRESSERI, A.: Über die Anwesenheit einer resorbierbaren, mit "clearing" Vermögen versehenen Substanz im normalen Magensaft. Naturwiss. 43, 36-37 (1956).
- CAPRARO, V. und CANTONE, S.: The possible physiological role and mechanism of action of an acid aminopolysaccharide isolated from hog gastric mucosa. Arch. Ital. Biol. 96, 187 (1958).
- CHIANTA, A.: Action of an extractiv heparinoid or biohumoral pattern (cholesterol and lipoproteins) of prostatic subjects. Zit. nach: Experiences

and studies on the biological, pharmacodynamic and clinical action of the duodenal heparinoid (1960). CRINOS S.p.A., Bibliographic section, Milano, Italy, Via San G.Cotolengo, 31.

CONSTANDINIDES, P., CAIRNS, A. und WERNER, A.: Antilipemic activity of sulfated polysaccharides. Arch. int. pharmacodyn. 99, 334-345 (1954).

DOLE, V.P.J.: A relation between nonesterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. Clin. Invest. 35, 150-154 (1956).

ENGELBERG, H.: Studies on the normal endogenous lipemia clearing factor. Circulation 10, 590 (1954).

FRAZER, A.C.: Normale und gestörte Fettresorption. Medizinische 1317-1321 (1953).

FREDRICKSON, D.S. und GORDON, R.S.: Transport of fatty acids. Physiol. Reviews 38, 585-630 (1958).

GALLO, E. und SERRA, G.C.: Effect of a heparinoid extracted from duodenal mucosa on the total cholesterolemia in atherosclerosis. Minerva cardiologia. 8, 395 (1960).

GORE, I. and LARKEY, B.J.: Functional activity of arterial mucopolysaccharides. Circulation 20, 976 (1959).

GRAHAM, D.M., T.P. LYON, J.W. GOFMAN, H.B. JONES, A. YANKLEY, J. SIMONTON and S. WHITE: Blood lipids and human atherosclerosis. II) The influence of heparin upon lipoprotein metabolism. Circulation 4, 666-673 (1951).

GROSSMAN, M.I.: The quantitative measurement of heparin-induced lipemia clearing activity of plasma. J. lab. clin. Med. 43, 445-451 (1954).

- GROSSMAN, M.I., J. STADLER, A. CUSHING and L. PALM: Relation of lipopysis to deturbidification and re-turbidification in heparin-induced lipemia clearing phenomenon. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 88, 132-135 (1955).
- GUAGLIANO, G., STOPPANI, L., CONTI, P.G.: Nouveautes therapeutiques des arteriopathies obliterantes chroniques peripheriques (A.O.C.P.) atherosclereuses. Zit. nach: Experiences and studies on the biological, pharmacodynamic and clinical action of the duodenal heparinoid (1960). CRINOS S.p.A., Bibliographic section, Milano, Italy, Via San G. Cottolengo, 31.
- HAHN, P.F.: Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. Science 98, 19-20 (1943).
- HEYMANN, W.: Zur langfristigen Heparinbehandlung der Arteriosklerose und der essentiellen Hyperlipaemie. Internist 2, 140-154 (1961).
- HOLLET, C. and H.C. MENG: Purification and characterization of the lipemia clearing factor of postheparin plasma. Biochim. biophys. Acta 20, 421-422 (1956).
- HOLLISTER, L.E. und KANTER, S.L.: Essential hyperlipemia treated with heparin and with chlorpromazine. Gastroenterology 29, 1069-1076 (1955).
- JEFFRIES, G.H.: The sites at which plasma clearing activity is produced and destroyed in the rat. Quart. J. exp. Physiol. 39, 261-270 (1954).
- JOBST, H.: Die Chylomicronen des Blutes (mit einem Beitrag zur Methode der Chylomicronenzählung im Serum). Klin. Wschr. 33, 746-750 (1955).

- JONES, R.J.: Serum cholesterol reduction in patients by the oral administration of a brain extract. J. lab. clin. Med. 47, 261 (1956).
- KORN, E.D.: Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I) Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. J. biol. Chem. 215, 1-14 (1955).
- KORN, E.D.: Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. II) Substrate specificity and activation of coconut oil. J. biol. Chem. 215, 15-26 (1955).
- KORN, E.D.: Inactivation of lipoprotein lipase by heparinase. Science 124, 489 (1956).
- KORN, E.D.: Inactivation of lipoprotein lipase by heparinase. J. biol. Chem. 226, 827-832 (1957).
- KORN, E.D.: Lipoprotein lipase. In: I.H. PAGE: Chemistry of lipids as related to atherosclerosis S.169-188, Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- KOVACS, B.M., KOVACS, G.S. und PETRI, G.: Lipemia clearing effect of chlorpromazine. Experientia (Basel) 12, 376 (1956).
- LINDGREN, F.T., FREEMAN, N.K. and D.M. GRAHAM: In vitro lipoprotein transformations. Circulation 6, 474-475 (1952).
- MASTROGIOVANNI, P.D.: The action of an extractiv heparinoid on the β/α -lipoproteins and serum cholesterol of neurologic patients, - observations on the Kunkel phenol reaction. Rassegna Neuropsichiatrica XIV (1960).
- NICHOLS, A.V., N.K. FREEMAN, B. SHORE and L. RUBIN: The interaction of "heparin active factor" and lipoproteins. Circulation 6, 457-458 (1952).

- NICROSINI, F. und FIOCCINELLI, O.: Modificazioni della lipemia totale e delle varie frazioni lipidiche indotte da un eparinoide estratto della mucosa duodenale. Giorn. Clin. Med. (Bologna) 40 Fasc. 8, 1271 (1959).
- NIKKILÄ, E.A.: Studies on the lipid-protein relationships in normal and pathological sera and the effect of heparin on serum lipoproteins. Scand. J. lab. Invest. 5, Suppl. 8 (1953).
- NIKKILÄ, E.A. and PESOLA, R.: Purification of clearing factor from postheparin plasma. Acta chem. scand. 10, 144-145 (1956).
- PERUZY, E.D. und L.SERENO: The effect of a heparinoid on the blood lipoprotein pattern and on the cholesterolemia level. Rassegna Fisiopatol. Clin. Terap. 12, 1363 (1957).
- POLTRONIERI, P., S.VENCO and N.GHELFI: Regarding the action of a new non-anticoagulation heparinoid on serum and plasma lipids. Atti Soc. Lombarda Sc. Med. Biol. 14, 1 (1959).
- RACCA, G., C.GHIA und A.BRINA: Results of the treatment with heparinoid in peripheral organic arteriopathies. Minerva medica 51, 78 (29.9.1960).
- ROBINSON, D.S.: The heparin clearing reaction. Amer. J. clin. Nutr. 8, 7-20 (1960).
- ROBINSON, D.S., G.H.JEFFRIES and J.E.FRENCH: Studies on the interaction of chyle and plasma in the rat. Quart. J. exp. Physiol. 39, 165-176 (1954).
- ROBINSON, D.S., P.M.HARRIS and C.R.RICKETTS: The production of lipolytic activity in rat plasma after the intravenous injection of dextran sulphate. Biochem. J. 71, 286-292 (1959).

- SABELLA, G. und DE SIMONE, M.: Modifications of the cholesterol level and the lipidogram in atherosclerosis treated with a new heparinoid devoid of anticoagulant action. Clin. terap. 18, 395 (1960).
- SCHETTLER, G.: Die klinische Bedeutung der Lipoproteidlipase. Bibl. haemat. 15, 106-126 (1963).
- SCHETTLER, G., M. EGGSTEIN, F. DIETRICH und H. JOBST: Zur Bestimmung der Serumlipoproteide mit der Zonen-
elektrophorese im Stärkemedium. Klin. Wschr. 35, 268-275 (1955).
- SCHOLL, H. und SCHETTLER, G.: Die Lipoproteidlipase und ihre klinische Bedeutung. Ergeb. inn. Med. Kinderheilk. 16, 245-291 (1961).
- SCHÖLL, H. und KOPITZKI, F.: Antilipämische Wirkung von saurem Na-Heparin bei sublingualer oder rectaler Verabreichung. Klin. Wschr. 14, 699-706 (1964).
- SCHULER, W., G. MÜLLER und F. MAIER: Lipämieklärung in vivo ohne Clearingfactor. Schweiz. Med. Wschr. 87, Nr. 25, 787-790 (1957).
- SCHULER, W. und G. F. SPRINGER: Experimentelle Antilipämiewirkung von Fucoidin. Naturwissenschaften 44, 265 (1957).
- SEIFTER, J. and D. H. BAEDER: Lipemia clearing by hyaluronidase, hyaluronate and desoxycorticosterone, and its inhibition by cortison, stress and nephrosis. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 86, 709-713 (1954).
- SHORE, B.: Heparin-activated enzyme system of human plasma. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 88, 73-75 (1955).

SWAHN,B.: Studies on the blood lipids. III) Electrophoretic mobility of "chylomicrons". Scand. J. clin. lab. Invest. 5, Suppl. 9, 80-110 (1953).

SWANK,R.L. and V.WILMOT: Chylomicra: Their composition and their fate after intravenous injection of small amounts of heparin. Amer. J. Physiol. 167, 403-412 (1951).

An dieser Stelle ist es mir eine angenehme Pflicht,
Herrn Professor Dr. Schettler für die Themenstellung
und für die großzügige Unterstützung bei der Durch-
führung der Arbeit herzlich zu danken.

Herr Privat-Dozent Dr. Wagener stand mir bei der
Durchführung der Experimente und bei der Auswertung
der Versuchsergebnisse mit seinem erfahrenen Rat
zur Seite. Ihm bin ich mit Dank verbunden.

L e b e n s l a u f

Am 28. März 1939 wurde ich, Ulrich Rolf Schulz, als Sohn des Rundfunkmechanikers Heinrich Schulz und dessen Ehefrau Paula, geb. Zesch, in Pritzwalk in der Mark Brandenburg geboren. Nach Besuch der Grundschule und der Oberschule in Pritzwalk legte ich 1957 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Wintersemester 1957 begann ich das Studium der Medizin an der Humboldt-Universität zu Berlin, an der ich im März 1960 die ärztliche Vorprüfung bestand. Seit dem Wintersemester 1961 studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin. Hier bestand ich am 17. April 1964 die ärztliche Prüfung. Nach zweijähriger Tätigkeit als Medizinalassistent an verschiedenen Berliner Krankenhäusern wurde mir zum 31. Juli 1966 die Bestallung als Arzt erteilt. Seit dem 1. August 1966 bin ich als Assistent am Pathologischen Institut des Städtischen Krankenhauses am Urban in Berlin-Kreuzberg tätig.

